

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-243949

(43)公開日 平成11年(1999)9月14日

(51)Int.Cl.⁶
C 1 2 N 9/04
1/21
9/96
15/09
// (C 1 2 N 9/04

識別記号

Z N A

F I
C 1 2 N 9/04
1/21
9/96
15/00

D

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数34 O L (全 18 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平10-50817

(22)出願日 平成10年(1998)3月3日

(71)出願人 000003160
東洋紡績株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(72)発明者 竹嶋 賢嗣
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内
(72)発明者 服部 静夫
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内
(72)発明者 川村 良久
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼおよびその製造方法

(57)【要約】

【課題】 遺伝子組換え技術により、低コストでしかも多量のPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼを提供する。

【解決手段】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組換えベクターによりPQQ生産能を有する微生物を形質転換することによって得られた形質転換体を培養し、該培養物から採取されるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼおよびその製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)または(b)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項2】 配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ。

【請求項3】 以下の(e)または(f)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ。

(e) 配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(f) アミノ酸配列(e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項4】 配列表・配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ。

【請求項5】 以下の(a)または(b)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項6】 配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

【請求項7】 以下の(c)または(d)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

(c) 配列表・配列番号2に記載された塩基配列からなるDNA

(d) 上記(c)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項8】 配列表・配列番号2に記載される塩基配列からなるDNAを有するPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

【請求項9】 以下の(e)または(f)のタンパク質

であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

(e) 配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(f) アミノ酸配列(e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

【請求項10】 配列表・配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

【請求項11】 以下の(g)または(h)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

(g) 配列表・配列番号4に記載された塩基配列からなるDNA

(h) 上記(g)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードしているDNA

【請求項12】 配列表・配列番号4に記載される塩基配列からなるDNAを有するPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。

【請求項13】 請求項5～12のいずれかに記載のPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項14】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片が組み込まれ、かつPQQ生産能を有する微生物において複製できることを特徴とする請求項13記載の組換えベクター。

【請求項15】 請求項13または14に記載の組換えベクターでPQQ生産能を有する微生物を形質転換した形質転換体。

【請求項16】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼがアシネットバクター・カルコアセティカス(Acinetobacter calcoaceticus)もしくはアシネットバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii)由来である請求項15記載の形質転換体。

【請求項17】 PQQ生産能を有する微生物がシードモナス(Pseudomonas)属またはアシネットバクター(Acinetobacter)属に属する微生物である請求項15記載の形質転換体。

【請求項18】 PQQ生産能を有する微生物がシードモナス・エルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、シードモナス・フルオレッセンス(Pseudomonas fluorescens)、シードモナス・プチダ(Pseudomonas putida)、アシネットバクター・カルコアセティカス(Acinetobacter calcoaceticus)、アシネットバクター・バウマ

ンニ (*Acinetobacter baumannii*) からなる群より選ばれた微生物である請求項15記載の形質転換体。

【請求項19】 PQQ生産能を有する微生物がシードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) である請求項17記載の形質転換体。

【請求項20】 PQQ生産能を有する微生物がアシネットバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcaceticus*) もしくはアシネットバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) である請求項17記載の形質転換体。

【請求項21】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが可溶性である請求項19または20に記載の形質転換体。

【請求項22】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を組込んでなる組換えベクターでPQQ生産能を有する微生物が形質転換された形質転換微生物を培養して、該培養物からPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼを採取するグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項23】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼがアシネットバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) もしくはアシネットバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) 由来の微生物である請求項22記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項24】 PQQ生産能を有する微生物がシードモナス (*Pseudomonas*) 属またはアシネットバクター (*Acinetobacter*) 属に属する微生物である請求項23記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項25】 PQQ生産能を有する微生物がシードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*) 、シードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) 、シードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 、アシネットバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 、アシネットバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) からなる群より選ばれた微生物である請求項23記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項26】 PQQ生産能を有する微生物がシードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) である請求項23記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項27】 PQQ生産能を有する微生物がアシネットバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcaceticus*) もしくはアシネットバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) である請求項23記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項28】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが可溶性である請求項26または27に記載のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項29】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをGOODの緩衝液の存在下に凍結乾燥して保持することを特徴とするグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法。

【請求項30】 カルシウムが共存する請求項29記載のグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法。

【請求項31】 GOODの緩衝液がPIPES、MES、MOPSからなる群より選ばれた緩衝液である請求項30または31に記載のグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法。

【請求項32】 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをGOODの緩衝液の存在下に凍結乾燥して保持されたものであることを特徴とする安定化されたグルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

【請求項33】 カルシウムが共存する請求項32記載のグルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

【請求項34】 GOODの緩衝液がPIPES、MES、MOPSからなる群より選ばれた緩衝液である請求項32または33に記載のグルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、PQQを補欠分子族とする新規なグルコースデヒドロゲナーゼ（以下、G DHとも言う）、該G DHをコードする遺伝子、該G DHをコードする遺伝子断片を組み込んでなる組換えベクター、該組換えベクターでPQQ生産能を有する微生物が形質転換された形質転換体、該形質転換体を培養することによるG DHの製造方法、G DHの安定化方法ならびに該安定化方法により安定化されたG DH組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】G DHは、1959年にノルウェーのJ. G. Haugeによって未知のキノン化合物を有する酵素として発見された。一方、PQQ (Pyrrolo Quinoline Quinone) は脱水素酵素の第三の補酵素として、1979年にその化学構造が決定されており、メタノール資化性菌のメタノール脱水素酵素や酢酸菌のアルコール脱水素酵素やグルコース脱水素酵素を中心に、多くの生物において、主として脱水素酵素でその存在が確認されている。

【0003】これらの脱水素酵素は人工電子受容体を還元できるので、ニトロブルーテトラゾリウムのような色素を用いると可視光で、しかも感度よく検出できること、およびNAD依存性脱水素酵素のように平衡反応ではなく一向向への反応であるので、微量の化合物の定量に極めて有用であるとされている（飴山実、*Methods in Enzymol.* 第89巻、20 (1982)）。

【0004】PQQを補欠分子族とする酵素の中で最も有用性が高いのは、PQQ依存性G DHであり、血糖の測定に用いることができる。実際の使用に関しては、通

常の生化学試薬としての使用はもちろん、膜に固定したドライ試薬の呈色反応やチップに固定したセンサー用途等幅広く応用することが可能である。グルコースに同様に作用するグルコースオキシダーゼやNAD (P) 依存性G D Hと比較し、溶存酸素の影響を受けないことや、反応がシンプルなためデバイスを簡単に、しかも安価にできることが特徴である。

【0005】上記P Q Qを補欠分子族とするG D Hのクローニングはアシネットバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) LMD79.41 (A.-M. Cleton-Jansenら, *J. Bacteriol.*, 170, 2121 (1988) および *Mol. Gen. Genet.*, 217, 430 (1989))、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) (A.-M. Cleton-Jansenら, *J. Bacteriol.*, 172, 6308 (1990))、グルコノバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) (*Mol. Gen. Genet.*, 229, 206 (1991)) 等で報告されており、大腸菌での発現も確認されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】遺伝的によく解析されおり、かつ形質転換する宿主として最適化されている大腸菌をはじめとする腸内細菌はP Q Qを産生しないことが知られており、もしP Q Qを補欠分子族とするG D Hをコードする遺伝子断片を組み込んでなるベクターで大腸菌を形質転換し、該大腸菌を培養しても活性のないアボ型G D Hしか得られないことが知られている。これらのアボ型G D Hは外からP Q Qを加えることにより活性のあるホロ型G D Hに変換可能であるが、必要とするP Q Qは試薬として非常に高価である。また、工業的スケールでは全てのアボ型がホロ型に変換されないことが確認されている。

【0007】また、*Biotechnol. Lett.*, 16, 12, 1265 (1994) には形質転換大腸菌を培養する際、培地にP Q Qを加えて活性のあるホロ型G D Hを生産することが報告されているが、この場合も高価なP Q Qを多量に用いる必要がある。さらに、*Mol. Gen. Genet.*, 229, 206 (1991) には、グルコノバクター・オキシダンスのG D Hをコードする遺伝子断片をグルコノバクター・オキシダンス自身の染色体に組み込んで発現させているが、この場合は染色体上に存在し、多コピーではないため発現量は小さい。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記目的を達成するために種々検討した結果、P Q Qを補欠分子族とするG D Hをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組換えベクターによりP Q Q生産能を有する微生物を形質転換することによって得られた形質転換微生物を培養し、該培養物からP Q Qを補欠分子族とするG D Hを採取することによって、安価にG D Hを大量生産できることを見出し、本発明に到達した。

【0009】すなわち、本発明は、P Q Qを補欠分子族とするG D Hをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組換えベクターでP Q Q生産能を有する微生物を形質転換することによって得られることを特徴とする形質転換微生物を、培養して培養物からP Q Qを補欠分子族とするG D Hを採取すること特徴とするG D Hの製造方法である。

【0010】本発明は、以下の(a)または(b)のタンパク質であるP Q Qを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼである。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

本発明は、配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるP Q Qを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼである。

【0011】本発明は、以下の(e)または(f)のタンパク質であるP Q Qを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼである。

(e) 配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(f) アミノ酸配列(e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

本発明は、配列表・配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるP Q Qを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼである。

【0012】本発明は、以下の(a)または(b)のタンパク質であるP Q Qを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

本発明は、配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるP Q Qを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

【0013】本発明は、以下の(c)または(d)のタンパク質であるP Q Qを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

(c) 配列表・配列番号2に記載された塩基配列からなるDNA

(d) 上記(c)の配列において、1もしくは数個の塩

基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

本発明は、配列表・配列番号2に記載される塩基配列からなるDNAを有するPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

【0014】本発明は、以下の(e)または(f)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

(e) 配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(f) アミノ酸配列(e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

本発明は、配列表・配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

【0015】本発明は、以下の(g)または(h)のタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

(g) 配列表・配列番号4に記載された塩基配列からなるDNA

(h) 上記(g)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードしているDNA

本発明は、配列表・配列番号4に記載される塩基配列からなるDNAを有するPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。

【0016】本発明は、上記PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含有する組換えベクターである。本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片が組み込まれ、かつPQQ生産能を有する微生物において複製できることを特徴とする上記組換えベクターである。

【0017】本発明は、上記の組換えベクターでPQQ生産能を有する微生物を形質転換した形質転換体である。本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼがアシネットバクター・カルコアセティカス(Acinetobacter calcoaceticus)もしくはアシネットバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii)由来である上記形質転換体である。本発明は、PQQ生産能を有する微生物がシュードモナス(Pseudomonas)属またはアシネットバクター(Acinetobacter)属に属する微生物である上記形質転換体である。

【0018】本発明は、PQQ生産能を有する微生物がシュードモナス・エルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、シュードモナス・フルオレッセンス(Pseudomonas fluorescens)、シュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida)、アシネットバクター・カルコアセティカス(Acinetobacter calcoaceticus)、アシネットバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii)からなる群より選ばれた微生物である上記形質転換体である。本発明は、PQQ生産能を有する微生物がアシネットバクター・カルコアセティカス(Acinetobacter calcoaceticus)もしくはアシネットバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii)である上記の形質転換体である。本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが可溶性である上記形質転換体である。

a)、シュードモナス・フルオレッセンス(Pseudomonas fluorescens)、シュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida)、アシネットバクター・カルコアセティカス(Acinetobacter calcoaceticus)、アシネットバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii)からなる群より選ばれた微生物である上記形質転換体である。本発明は、PQQ生産能を有する微生物がシュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida)である上記形質転換体である。本発明は、PQQ生産能を有する微生物がアシネットバクター・カルコアセティカス(Acinetobacter calcoaceticus)もしくはアシネットバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii)である上記の形質転換体である。本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが可溶性である上記形質転換体である。

【0019】本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を組込んでなる組換えベクターでPQQ生産能を有する微生物が形質転換された形質転換微生物を培養して、該培養物からPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼを採取するグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。

【0020】本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼがアシネットバクター・カルコアセティカス(Acinetobacter calcoaceticus)もしくはアシネットバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii)由来の微生物である上記のグルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。本発明は、PQQ生産能を有する微生物がシュードモナス(Pseudomonas)属またはアシネットバクター(Acinetobacter)属に属する微生物である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。

【0021】本発明は、PQQ生産能を有する微生物がシュードモナス・エルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、シュードモナス・フルオレッセンス(Pseudomonas fluorescens)、シュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida)、アシネットバクター・カルコアセティカス(Acinetobacter calcoaceticus)、アシネットバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii)からなる群より選ばれた微生物である上記形質転換体である。本発明は、PQQ生産能を有する微生物がシュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida)である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。本発明は、PQQ生産能を有する微生物がアシネットバクター・カルコアセティカス(Acinetobacter calcoaceticus)もしくはアシネットバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii)である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが可溶性である上記グルコースデヒドロゲナーゼの製造方法である。

る。

【0022】本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをGOODの緩衝液の存在下に凍結乾燥して保持することを特徴とするグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法である。本発明は、カルシウムが共存する上記グルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法である。本発明は、GOODの緩衝液がPIPS、MES、MOPSからなる群より選ばれた緩衝液である上記グルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法である。

【0023】本発明は、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをGOODの緩衝液の存在下に凍結乾燥して保持されたものであることを特徴とする安定化されたグルコースデヒドロゲナーゼ組成物である。本発明は、カルシウムが共存する上記のグルコースデヒドロゲナーゼ組成物である。本発明は、GOODの緩衝液がPIPS、MES、MOPSからなる群より選ばれた緩衝液である上記のグルコースデヒドロゲナーゼ組成物である。

【0024】

【発明の実施の形態】本発明のPQQを補欠分子族とするGDHをコードする遺伝子を含むDNA断片は、GDH生産菌より得ることができる。該GHD生産菌として、具体的には、例えばアシネットバクター・カルコアセティカス、アシネットバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)、シードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、グルコノバクター・オキシダンス等の酸化細菌やアグロバクテリウム・ラジオバクター (*Agrobacterium radiobacter*)、エシェリヒア・コリ、クレブシーラ・エーロジーンズ (*Klebsiella aerogenes*)等の腸内細菌を挙げることができる。なかでも、アシネットバクター・カルコアセティカスもしくはアシネットバクター・バウマンニの可溶性GHDが好ましい。

【0025】該GHDをコードする遺伝子はこれらの菌株より抽出してもよく、また化学的に合成することもできる。さらに、PCR法の利用により、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片を得ることも可能である。

【0026】上記GHDをコードする遺伝子としては、例えば(a)配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子、または(b)アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が挙げられる。

【0027】また、(e)配列表・配列番号3に記載されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子、または(f)アミノ酸配列(e)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質であるPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子も挙げができる。

【0028】さらに、(c)配列表・配列番号2に記載された塩基配列からなるDNA、または(d)上記(c)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードしているDNAがある。

【0029】さらに、(g)配列表・配列番号4に記載された塩基配列からなるDNA、または(h)上記(g)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードしているDNAがある。

【0030】本発明において、GHDをコードする遺伝子を得る方法としては、次のような方法が挙げられる。例えばアシネットバクター・カルコアセティカスNCIB11517の染色体を分離、精製した後、超音波処理、制限酵素処理等を用いてDNAを切断したものと、リニアーナー発現ベクターと両DNAの平滑末端または付着末端においてDNAリガーゼなどにより結合閉鎖させて組換えベクターを構築する。該組換えベクターを複製可能な宿主微生物に移入した後、ベクターのマーカーと酵素活性の発現を指標としてスクリーニングして、PQQを補欠分子族とするGHDをコードする遺伝子を含有する組換えベクターを保持する微生物を得る。

【0031】次いで、上記組換えベクターを保持する微生物を培養して、該培養微生物の菌体から該組換えベクターを分離、精製し、該発現ベクターからGHDをコードする遺伝子を採取することができる。例えば、遺伝子供与体であるアシネットバクター・カルコアセティカスNCIB11517の染色体DNAは、具体的には以下のようにして採取される。

【0032】該遺伝子供与微生物を例えば1~3日間攪拌培養して得られた培養液を遠心分離により集菌し、次いで、これを溶菌させることによりPQQを補欠分子族とするGHD遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌の方法としては、例えばリゾチーム等の溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素やラウリル硫酸ナトリウム(SDS)等の界面活性剤が併用される。さらに、凍結融解やフレンチプレス処理のような物理的破碎方法と組み合わせてもよい。

【0033】上記のようにして得られた溶菌物からDNAを分離精製するには、常法に従って、例えばフェノー

ル処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理や、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

【0034】微生物から分離、精製されたDNAを切断する方法は、例えば超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができる。好ましくは特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素が適している。

【0035】クローニングする際のベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えばエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合にはLambda gt10、Lambda gt11などが例示される。また、プラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pBR322、pUC19、pBluescriptなどが例示される。

【0036】クローニングの際、上記のようなベクターを、上述したG DHをコードする遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素で切断してベクター断片を得ることができるが、必ずしも該微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同一の制限酵素を用いる必要はない。微生物DNA断片とベクターDNA断片とを結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であればよく、例えば微生物DNA断片の付着末端とベクター断片の付着末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの使用により微生物DNA断片とベクターDNA断片との組換えベクターを作成する。必要に応じて、アニーリングの後、宿主微生物に移入して生体内のDNAリガーゼを利用し組換えベクターを作製することもできる。

【0037】クローニングに使用する宿主微生物としては、組換えベクターが安定であり、かつ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質発現できるものであれば特に制限されない。一般的には、エシェリヒア・コリW3110、エシェリヒア・コリC600、エシェリヒア・コリHB101、エシェリヒア・コリJM109、エシェリヒア・コリDH5 α などを用いることができる。

【0038】宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合には、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポーリーション法などを用いることができる。

【0039】上記のように得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量のG DHを安定に生産し得る。宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカーとPQQの添加によりG DH活性を同時に発現する微生物を検索すればよい。例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつG DHを生成する微生物を選択すればよい。

【0040】上記の方法により得られたPQQを補欠分

子族とするG DH遺伝子の塩基配列は、Science、第214巻、1205(1981)に記載されたジデオキシ法により解読した。また、G DHのアミノ酸配列は上記のように決定された塩基配列より推定した。

【0041】上記のようにして、一度選択されたPQQを補欠分子族とするG DH遺伝子を保有する組換えベクターより、PQQ生産能を有する微生物にて複製できる組換えベクターへの移入は、G DH遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法によりG DH遺伝子であるDNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによるPQQ生産能を有する微生物の形質転換は、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポーリーション法などを用いることができる。

【0042】PQQ生産能を有する微生物としては、メチロバクテリウム(Methylobacterium)属等のメタノール資化性細菌、アセトバクター(Acetobacter)属やグルコノバクター(Gluconobacter)属の酢酸菌、フラババクテリウム(Flavobacterium)属、シュードモナス属、アシネットバクター属等の細菌を挙げることができる。なかでも、シュードモナス属細菌とアシネットバクター属細菌が利用できる宿主ベクター系が確立されており利用しやすいので好ましい。

【0043】シュードモナス属細菌では、シュードモナス・エルギノサ、シュードモナス・フルオレッセンス、シュードモナス・プチダなどを用いることができる。また、アシネットバクター属細菌ではアシネットバクター・カルコアセティカス、アシネットバクター・バウマンニ等を用いることができる。

【0044】上記微生物にて複製できる組換えベクターとしては、RSF1010由来のベクターもしくはとその類似のレプリコンを有するベクターがシュードモナス属細菌に利用可能である。例えば、pKT240、pMMB24等(M.M.Bagdasarianら, Gene, 26, 273(1983))、pCN40、pCN60等(C.C.Nietoら, Gene, 87, 145(1990))やpTS1137等を挙げることができる。また、pME290等(Y.Itohら, Gene, 36, 27(1985))、pN1111、pN120C(N.Itohら, J.Biochem., 110, 614(1991))も利用できる。

【0045】アシネットバクター属細菌では、pWM43等(W.Minasら, Appl. Environ. Microbiol., 59, 2807(1993))、pKT230、pWH1266等(M.Hungerら, Gene, 87, 45(1990))がベクターとして利用可能である。

【0046】形質転換体である宿主微生物の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

【0047】培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては

資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、ラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

【0048】培養温度は菌が成育し、G D Hを生産する範囲で適宜変更し得るが、上記のようなP Q Q生産能を有する微生物の場合、好ましくは20~42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、G D Hが最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を完了すればよく、通常は12~72時間程度である。培地のp Hは菌が発育し、G D Hを生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはp H 6. 0~9. 0程度の範囲である。

【0049】培養物中のG D Hを生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、G D Hが培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、G D H含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。G D Hが菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素の方法で破壊し、また、必要に応じて、E D T A等のキレート剤及び界面活性剤を添加してG D Hを可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0050】上記のようにして得られたG D H含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを行うことにより、精製されたG D Hを得ることができる。

【0051】例えば、セファデックス (Sephadex) ゲル (ファルマシアバイオテク) などによるゲルろ過、D E A EセファロースCL-6B (ファルマシアバイオテク) 、オクチルセファロースCL-6B (ファルマシアバイオテク) 等のカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。該精製酵素標品は、電気泳動 (S D S-PAGE) 的に単一のバンドを示す程度に純化されていることが好ましい。

【0052】上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉

末化して流通させることが可能である。その際、精製酵素はリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液やG O O Dの緩衝液に溶解しているものを用いることができる。好適なものはG O O Dの緩衝液であり、なかでも、P I P E S、M E SもしくはM O P S緩衝液が特に好ましい。また、カルシウムイオンまたはその塩、およびグルタミン酸、グルタミン、リジン等のアミノ酸類、さらに血清アルブミン等を添加することによりG D Hをより安定化することができる。

【0053】本発明のP Q Qを補欠分子とするG D Hの一例は、以下に示すような理化学的性質を有する。

作用: D-グルコース + 人工電子受容体 → δ-グルコノラクトン+還元型電子受容体

熱安定性: 約50℃以下 (p H 7. 5、30分間処理)

p H安定性: 3. 5~8. 5 (25℃、16時間処理)

至適温度: 約40℃

至適p H: 7. 0

分子量: 50000

【0054】本発明において、補欠分子族とするG D H活性の測定は以下の条件で行う。

【0055】<試薬>

5.0mM P I P E S緩衝液 (p H 6. 5)

0. 2mM P M S

0. 2mM N T B

3. 0. 6mM グルコース

0. 19% トリトンX-100

【0056】<測定条件>上記試薬混液3m lを37℃で約5分予備加温後、0. 1m lの酵素溶液を加え、緩やかに混和後、水を対照に37℃に制御された分光光度計で5分間記録し、その直線部分から1分間あたりの吸光度変化を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に吸光度変化を測定する。上記条件で1分間に1/2 μmolのジホルマザンを生成する酵素量を1単位 (U) とする。

【0057】

【実施例】以下、実施例により、本発明を具体的に説明する。

実施例1: 染色体D N Aの分離

アシネットバクター・カルコアセティカスNCIB11517の染色体D N Aを次の方法で分離した。同菌株を100m lのL B培地で30℃、一晩振とう培養した後、遠心分離 (8000r p m、10分間) により集菌した。20%シュークロース、5.0mMトリス/塩酸緩衝液 (p H 7. 6)、1mM E D T Aを含んだ溶液5m lに懸濁し、1m lのプロティナーゼK溶液 (100mg/m l) を加えて37℃、30分間保温し、次いで、1m lの10%ラウロイルサルコシンナトリウム溶液を加えた。

【0058】上記溶液に等量のクロロホルム・フェノール溶液 (1:1) を加え、攪拌混合し、10000r p

m、3分間の遠心で水層と溶媒層に分け、水層を分取した。該水層に2倍量のエタノールを静かに重層し、ガラス棒でゆっくり攪拌しながらDNAをガラス棒に巻き付かせて分離した。これを1mM EDTAを含んだトリス／塩酸緩衝液(pH 8.0以下、TEと略記する)で溶解した。これを等量のクロロホルム・フェノール溶液で処理後、遠心分離により水層を分取し、2倍量のエタノールを加えて、上記方法で再度DNAを分離し、2mLのTEで溶解した。

【0059】実施例2：PQQを補欠分子族とする可溶性G DHをコードする遺伝子を含有するDNA断片及び該DNA断片を有する組換えベクターの調製
実施例1で得たDNA 5 μgを制限酵素Sau3AI(東洋紡績製)で部分分解し、2kb以上の断片にした後、BamHI(東洋紡績製)で切断したpBluescript KS(+) 1 μgとT4 DNAリガーゼ(東洋紡績製)1単位で16℃、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒアJM109のコンピテントセル(東洋紡績製)を用いて形質転換した。使用したDNA 1 μg当たり約105個の形質転換体のコロニーが得られた。

【0060】次いで、得られたコロニーは50 μg/mLアンピシリンを含んだLB培地で30℃、24時間培養し、リゾチーム破碎後、PQQを添加し、該粗酵素液の可溶性G DH活性を測定した。その結果、1株のPQQを補欠分子族とするG DH生産株を見出した。該菌株の保有するプラスミドには約8kbの挿入DNAが存在しており、該プラスミドをpPGH1とした。

【0061】該プラスミドDNA 5 μgを制限酵素MboI(東洋紡績製)で切断してアガロースゲル電気泳動を行ない、可溶性G DH遺伝子を含む長さ約1.9kbの断片を切り出した。単離したDNAとEcoRV(東洋紡績製)で切断したpBluescriptKS(+) 1 μgとをT4 DNAリガーゼ1単位で16℃、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリJM109のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られたコロニー中にG DH遺伝子を有するプラスミドを有するコロニーを見出し、該プラスミドをpPGH2と命名した。

【0062】実施例3：塩基配列の決定
pPGH2の挿入DNA断片について常法に従い、デリーションミュータントを調製した。種々のサブクローンは常法に従い、シーケンシング・キット(Radioactive Sequencing Kit)(東洋紡績製)を用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列およびアミノ酸配列は配列番号1および2に示す通りである。アミノ酸配列から求められる蛋白質の分子量は約52800であり、アシネットバクター・カルコアセティカスNCIB11517のG DHの分子量とほぼ一致した。

【0063】実施例4：アシネットバクター・バウマンニJCM6841の可溶性G DHの塩基配列の決定

アシネットバクター・バウマンニJCM6841の染色体DNAを実施例1と同様の方法で分離し、PQQを補欠分子族とする可溶性G DHをコードする遺伝子を含有するDNA断片及び該DNA断片を有する組換えベクターの調製を実施例2と同様に実施し、約7Kbpの挿入断片を有するpPGH6を取得した。該プラスミドよりG DHをコードする遺伝子を含有するDNA断片を含む4kbのDNA断片を常法により、サブクローニングしてpPGH7を構築した。

【0064】次に、pPGH7の挿入DNA断片について常法に従いデリーションミュータントを調製した。種々のサブクローンは常法に従い、シーケンシング・キット(Radioactive Sequencing Kit)(東洋紡績製)を用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列およびアミノ酸配列は配列番号3および4に示す通りである。アミノ酸配列から求められる蛋白質の分子量は約53000であり、アシネットバクター・バウマンニJCM6841のG DHの分子量とほぼ一致した。

【0065】実施例5：ショードモナス属細菌で複製できる発現ベクターの構築

実施例3で得たプラスミドDNA 5 μgを制限酵素BamHIおよびXhol(東洋紡績製)で切断して、G DH遺伝子を含む長さ1.9Kbの断片を含むDNAを単離した。単離したDNAとBamHIおよびXholで切断したpTS1137を1 μgとをT4 DNAリガーゼ1単位で16℃、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリDH5αのコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られたコロニー中にG DH遺伝子を有するプラスミドを有するコロニーを見出し、該プラスミドをpGLD3と命名した。

【0066】実施例6：アシネットバクター属細菌で複製できる発現ベクターの構築

実施例3で得たプラスミドDNA 5 μgを制限酵素MboI(東洋紡績製)で切断して、G DH遺伝子を含む長さ1.9Kbの断片を含むDNAを単離した。単離したDNAとMscl(東洋紡績製)で切断したpWH1266を1 μgとをT4 DNAリガーゼ1単位で16℃、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリDH5αのコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られたコロニー中にG DH遺伝子を有するプラスミドを有するコロニーを見出し、該プラスミドをpGLD4と命名した。

【0067】比較例1：エシェリヒア・コリ宿主用発現ベクターの構築

実施例3で得たプラスミドDNA 5 μgを制限酵素MboI(東洋紡績製)で切断して、G DH遺伝子を含む長さ1.8Kbの断片を含むDNAを単離した。単離したDNAとEcoRVで切断したpBluescript KS(+) 1 μgとをT4 DNAリガーゼ1単位で16℃、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア

・コリJM109のコンピテンツセルを用いて形質転換を行った。得られたコロニー中にG DH遺伝子を有するプラスミドを有するコロニーを見出し、該プラスミドをpGLD5と命名した。

【0068】比較例2：エシェリヒア・コリJM109/pGLD5からのPQQを補欠分子族とするG DHの製造Terrific broth 500m1を2Lフラスコに分注し、121℃、15分間オートクレーブを行い、放冷後、別途無菌ろ過した50mg/m1アンピシリン0.5m1を添加した。該培地にLB培地で予め、30℃、24時間振とう培養したエシェリヒア・コリJM109/pGGLD5の培養液5m1を接種し、37℃で24時間通気攪拌培養した。培養終了時のG DH活性は約0.34U/m1であった。一方、活性測定試薬に10μmolのPQQを添加後、活性測定すると120U/m1であった。

【0069】実施例7：PQQ生産能を有する微生物の形質転換体の作製

シュードモナス・プチダTE3493(微工研寄12298号)をLBG培地(LB培地+0.3%グリセロール)で30℃、16時間培養し、遠心分離(12000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュークロースを含む5mM K-リン酸緩衝液(pH7.0)8m1を加え、菌体を懸濁した。再度遠心分離(12000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュークロースを含む5mM K-リン酸緩衝液(pH7.0)0.4m1を加え、菌体を懸濁した。

【0070】該懸濁液に実施例5で得たプラスミドDNA(pGLD3)0.5μgを加え、エレクトロポーレーション法により形質転換した。50μg/m1ストレプトマイシンを含んだLB培地に生育したコロニーより、PQQを補欠分子族とする可溶性G DH活性を有するクローンを得た。

【0071】同様に、上記pGLD3を用いて、シュードモナス・プチダTN1126株、シュードモナス・エルギノサPA01162株、シュードモナス・フルオレッセンスIF012568株より形質転換体を取得した。

【0072】また、アシネットバクター・カルコアセティカスNCIB11517をLB培地で30℃、16時間培養し、遠心分離(12000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した滅菌水8m1を加え、菌体を懸濁した。再度遠心分離(12000rpm、10分間)により菌体を回収し、該菌体に10%グリセロール0.4m1を加え、菌体を懸濁した。

【0073】該懸濁液50μlに実施例6で得たプラスミドDNA(pGLD4)0.5μgを加え、エレクトロポーレーション法により形質転換した。テトラサイクリン50μg/m1を含んだLB培地に生育したコロニーより、PQQを補欠分子族とする可溶性G DH活性を有するクローンを得た。

【0074】実施例8：得られた形質転換体によるG DH活性発現量の比較

実施例7で得られた5種の形質転換体、比較例2で得られた形質転換体および対照としてアシネットバクター・カルコアセティカスNCIB11517をTerrific broth 50m1(1.2%ポリペプトン、2.4%酵母エキス、0.4%NaCl、1.7mM KH₂PO₄、7.2mM K₂HPO₄、pH7.0)で30℃、24時間培養し、遠心分離(12000rpm、3分間)により菌体を回収した。該菌体を1mMのCaCl₂を含んだ50mMトリス/塩酸緩衝液、pH7.5に懸濁後、超音波により菌体を破碎した。遠心分離(12000rpm、5分間)によって菌体残さを除去した、粗酵素液を調製後、G DH活性を測定した。その結果を表1に示す。

【0075】実施例9：シュードモナス・プチダTE3493/pGLD3からのPQQを補欠分子族とするG DHの製造Terrific broth 500m1を2Lフラスコに分注し、121℃、15分間オートクレーブを行い、放冷後、別途無菌ろ過した50mg/m1ストレプトマイシン0.5m1を添加した。該培地にLB培地で予め、30℃、24時間振とう培養した実施例7で得られたシュードモナス・プチダTE3493/pGLD3の培養液5m1を接種し、37℃で48時間通気攪拌培養した。培養終了時のG DH活性は約45U/m1であった。

【0076】上記菌体を遠心分離にて集菌し、20mMリン酸緩衝液、pH7.0に懸濁した。該菌体懸濁液をフレンチプレスで破碎後、遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。該粗酵素液をポリエチレンイミンによる除核酸処理および硫安分画処理を行った後、セファデックスG-25(ファルマシアバイオテク)によるゲルろ過により脱塩し、CMセファロース(ファルマシアバイオテク)、フェニルセファロース(ファルマシアバイオテク)カラムクロマトグラフィーにより分離、精製して、精製酵素標品を得た。

【0077】上記の方法により得られたG DH標品は電気泳動(SDS-PAGE)的にはほぼ単一のバンドを示し、この際の比活性は約2100U/mg-タンパク質であった。

【0078】以下に、上記方法により得られたPQQを補欠分子族とするG DHの性質を示す。

作用:D-グルコース + 人工電子受容体 → δ-グルコノラクトン+還元型電子受容体

熱安定性:約50℃以下(pH7.5, 30分間処理)

pH安定性:3.5~8.5(25℃, 16時間処理)

至適温度:約40℃

至適pH:7.0

分子量:50000

【0079】上記菌体を遠心分離にて集菌し、20mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁した。該菌体懸濁液をフレンチプレスで破碎後、遠心分離を行い、上清液を

粗酵素液として得た。該粗酵素液をポリエチレンイミンによる除核酸処理および硫安分画処理を行った後、セファデックスG-25（ファルマシアバイオテク）によるゲルろ過により脱塩し、CMセファロース（ファルマシアバイオテク）、フェニルセファロース（ファルマシアバイオテク）、カラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得た。

【0080】本方法により得られたG D H標品は電気泳動（SDS-PAGE）的にほぼ単一のバンドを示し、この際の比活性は約85U/mg-タンパク質であった。この酵素を1mMのCaCl₂および10μmol

形質転換体によるグルコースデヒドロゲナーゼ活性発現量

形質転換体	活性発現量 (U/ml)
<i>P. putida</i> TB3493/pGLD3	4.3
<i>P. putida</i> TN1126/pGLD3	2.6
<i>P. aeruginosa</i> PA01162/pGLD3	3.0
<i>P. fluorescens</i> IF012568/pGLD3	2.7
<i>A. calcoaceticus</i> NCIB11517/pGLD4	2.2
<i>E. coli</i> JM109/pGLD5 (比較例2)	0.23
<i>A. calcoaceticus</i> NCIB11517 (対照)	1.6

培養液1ml当たりの酵素活性

【0083】

【表2】
グルコースデヒドロゲナーゼ粉末の安定性

緩衝液	残存活性 (%)	
	凍結乾燥直後	37℃, 3日間
トリス塩酸, pH 7.5	98.6	38.8
PIPES, pH 6.5	99.8	101.0
MES, pH 6.5	102.0	99.6
MOPS, pH 6.5	99.2	52.4
HEPES, pH 7.0	101.0	28.3

凍結乾燥前のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を100とする

【0084】

【発明の効果】上述したように、本発明において、PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼが単離された。また、PQQ生産能を有する微生物を用いた

のPQQ存在下、37℃、1時間インキュベートした後、比活性を測定したが、約460U/mg-タンパク質に過ぎなかった。

【0081】実施例10: G D Hの粉末化

1mMのCaCl₂およびBSA (G D H 1.0重量部に対して1.0重量部)を含む各種緩衝液中に溶解した実施例9のG D Hを凍結乾燥した後、37℃におけるG D H活性の残存性を測定した。その結果を表2に示す。

【0082】

【表1】

【表2】

グルコースデヒドロゲナーゼ粉末の安定性

宿主-ベクター系を利用する遺伝子工学技術により、PQQを補欠分子族とするG D Hの製造方法が確立された。本発明の製造方法によれば、高純度なPQQを補欠分子族とするG D Hを安価に効率よく生産することが可

能である。

【0085】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：480

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

起源

生物名：アシネトバクター・カルコアセティカス (Acinetobacter calcoaceticus)

株名：NCIB11517

配列

Met	Asn	Lys	His	Leu	Leu	Ala	Lys	Ile	Thr	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Gln
1								5				10			15
Leu	Phe	Thr	Phe	His	Thr	Ala	Phe	Ala	Asp	Ile	Pro	Leu	Thr	Pro	Ala
										20		25			30
Gln	Phe	Ala	Lys	Ala	Lys	Thr	Glu	Asn	Phe	Asp	Lys	Lys	Val	Ile	Leu
										35		40			45
Ser	Asn	Leu	Asn	Lys	Pro	His	Ala	Leu	Leu	Trp	Gly	Pro	Asp	Asn	Gln
										50		55			60
Ile	Trp	Leu	Thr	Glu	Arg	Ala	Thr	Gly	Lys	Ile	Leu	Arg	Val	Asn	Pro
										65		70			80
Val	Ser	Gly	Ser	Ala	Lys	Thr	Val	Phe	Gln	Val	Pro	Glu	Ile	Val	Ser
										85		90			95
Asp	Ala	Asp	Gly	Gln	Asn	Gly	Leu	Leu	Gly	Phe	Ala	Phe	His	Pro	Asp
										100		105			110
Phe	Lys	His	Asn	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Ile	Ser	Gly	Thr	Phe	Lys	Asn	Pro
										115		120			125
Lys	Ser	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Pro	Asn	Gln	Thr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr
										130		135			140
Thr	Tyr	Asn	Lys	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Lys	Pro	Ile	Asp	Leu	Ile	
										145		150			160
Ala	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Lys	Asp	His	Gln	Ser	Gly	Arg	Leu	Val	Ile
										165		170			175
Gly	Pro	Asp	Gln	Lys	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ile	Gly	Asp	Gln	Gly	Arg	Asn
										180		185			190
Gln	Leu	Ala	Tyr	Leu	Phe	Leu	Pro	Asn	Gln	Ala	Gln	His	Thr	Pro	Thr
										195		200			205
Gln	Gln	Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	Asp	Tyr	His	Thr	Tyr	Met	Gly	Lys	Val
										210		215			220
Leu	Arg	Leu	Asn	Leu	Asp	Gly	Ser	Val	Pro	Lys	Asp	Asn	Pro	Ser	Phe
										225		230			240
Asn	Gly	Val	Val	Ser	His	Ile	Tyr	Thr	Leu	Gly	His	Arg	Asn	Pro	Gln
										245		250			255
Gly	Leu	Ala	Phe	Ala	Pro	Asn	Gly	Lys	Leu	Leu	Gln	Ser	Glu	Gln	Gly
										260		265			270
Pro	Asn	Ser	Asp	Asp	Glu	Ile	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Gly	Gly	Asn	Tyr
										275		280			285
Gly	Trp	Pro	Asn	Val	Ala	Gly	Tyr	Lys	Asp	Asp	Ser	Gly	Tyr	Ala	Tyr
										290		295			300
Ala	Asn	Tyr	Ser	Ala	Ala	Thr	Asn	Lys	Ser	Gln	Ile	Lys	Asp	Leu	Ala
										305		310			320
Gln	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Val	Thr	Lys	Glu	Ser
										325		330			335
Glu	Trp	Thr	Gly	Lys	Asn	Phe	Val	Pro	Pro	Leu	Lys	Thr	Leu	Tyr	Thr

340	345	350	
Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala			
355	360	365	
Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr			
370	375	380	
Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro			
385	390	395	400
Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr			
405	410	415	
Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg			
420	425	430	
Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu			
435	440	445	
Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His			
450	455	460	
Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys			
465	470	475	480

【0086】配列番号：2

配列の長さ：1443

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムDNA

起源

生物名：アシネトバクター・カルコアセティカス (Acinetobacter calcoaceticus)

株名：NCIB11517

配列

ATG AAT AAA CAT TTA TTA GCA AAA ATC ACT CTT TTA GGT GCT GCA CAA	48
Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln	
1 5 10 15	
CTA TTT ACG TTT CAT ACG GCA TTT GCA GAT ATA CCT CTG ACA CCT GCT	96
Leu Phe Thr Phe His Thr Ala Phe Ala Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala	
20 25 30	
CAG TTC GCA AAA GCG AAA ACA GAA AAT TTT GAT AAA AAA GTG ATT CTG	144
Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr Glu Asn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu	
35 40 45	
TCC AAT TTA AAT AAA CCA CAT GCT TTG TTA TGG GGG CCA GAT AAT CAA	192
Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln	
50 55 60	
ATT TGG TTA ACC GAA CGT GCA ACT GGC AAA ATT TTA AGA GTA AAT CCT	240
Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro	
65 70 75 80	
GTA TCT GGT AGC GCG AAA ACA GTA TTT CAG GTT CCT GAA ATT GTG AGT	288
Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Ser	
85 90 95	
GAT GCT GAT GGG CAA AAT GGT TTG TTA GGT TTT GCT TTT CAT CCT GAC	336
Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp	
100 105 110	
TTT AAA CAT AAC CCT TAT ATC TAT ATT TCA GGC ACT TTT AAA AAT CCA	384
Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro	
115 120 125	
AAA TCT ACA GAT AAA GAG TTA CCT AAT CAG ACG ATT ATT CGT AGA TAT	432
Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr	
130 135 140	

ACC TAT AAT AAA ACT ACA GAT ACA TTT GAA AAG CCT ATT GAT TTG ATT 480
 Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile
 145 150 155 160
 GCA GGT TTA CCG TCA TCA AAA GAT CAT CAG TCT GGT CGT CTC GTT ATT 528
 Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile
 165 170 175
 GGT CCA GAC CAA AAA ATC TAC TAT ACG ATT GGT GAC CAA GGT CGT AAT 576
 Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn
 180 185 190
 CAG TTA GCT TAT CTG TTC TTA CCG AAT CAG GCA CAG CAT ACT CCG ACT 624
 Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr
 195 200 205
 CAG CAA GAG CTC AAT AGT AAA GAC TAC CAT ACA TAT ATG GGT AAA GTA 672
 Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val
 210 215 220
 TTA CGC TTA AAT CTG GAC GGC AGT GTA CCT AAA GAC AAC CCA AGC TTT 720
 Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Val Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe
 225 230 235 240
 AAC GGC GTA GTG AGT CAT ATC TAC ACT TTA GGG CAC CGT AAT CCA CAA 768
 Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln
 245 250 255
 GGT TTA GCA TTT GCC CCA AAT GGA AAG CTT TTA CAA TCT GAG CAA GGA 816
 Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly
 260 265 270
 CCA AAT TCT GAT GAT GAA ATT AAC CTT GTA TTA AAA GGT GGT AAC TAT 864
 Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr
 275 280 285
 GGC TGG CCA AAT GTA GCT GGT TAT AAA GAT GAC AGT GGT TAT GCC TAT 912
 Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr
 290 295 300
 GCA AAC TAT TCG GCA GCA ACC AAT AAA TCA CAA ATT AAA GAT TTA GCT 960
 Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala
 305 310 315 320
 CAA AAC GGG ATA AAA GTA GCA ACA GGT GTT CCT GTG ACT AAA GAG TCT 1008
 Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser
 325 330 335
 GAA TGG ACT GGT AAA AAC TTT GTG CCG CCT TTG AAA ACT TTA TAT ACG 1056
 Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr
 340 345 350
 GTA CAA GAT ACC TAT AAC TAT AAT GAC CCT ACT TGT GGT GAG ATG GCA 1104
 Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala
 355 360 365
 TAT ATT TGC TGG CCA ACG GTT GCA CCG TCA TCA GCA TAT GTA TAT ACG 1152
 Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr
 370 375 380
 GGA GGC AAA AAA GCG ATT CCA GGG TGG GAA AAT ACA TTA TTG GTC CCA 1200
 Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro
 385 390 395 400
 TCT TTA AAA CGT GGG GTG ATT TTC CGT ATT AAA TTG GAC CCG ACA TAT 1248
 Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr

405	410	415
AGC ACG ACT TTG GAT GAT GCT ATC CCA ATG TTT AAA AGC AAT AAC CGT 1296		
Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg		
420	425	430
TAT CGT GAT GTC ATC GCT AGT CCA GAA GGT AAT ACC TTA TAT GTG CTG 1344		
Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu		
435	440	445
ACT GAT ACA GCG GGG AAT GTC CAA AAA GAT GAT GGT TCT GTC ACT CAT 1392		
Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His		
450	455	460
ACT TTA GAG AAT CCC GGT TCT CTC ATT AAA TTT ACA TAT AAC GGT AAG 1440		
Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys		
465	470	475
480		
TAA 1443		

【0087】配列番号：3

配列の長さ：480

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

起源

生物名：アシネトバクター・バウマンニ (Acinetobacter baumannii)

株名：JCM6841

配列

Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln		
1	5	10
Leu Phe Thr Phe His Thr Ala Phe Ala Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala		
20	25	30
Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr Glu Asn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu		
35	40	45
Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln		
50	55	60
Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro		
65	70	75
Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Ser		
85	90	95
Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp		
100	105	110
Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro		
115	120	125
Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr		
130	135	140
Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile		
145	150	155
Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile		
165	170	175
Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn		
180	185	190
Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Ser Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr		
195	200	205
Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val		
210	215	220
Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe		
225	230	235
240		

Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln
 245 250 255
 Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly
 260 265 270
 Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Val Leu Lys Gly Gln Asn Tyr
 275 280 285
 Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr
 290 295 300
 Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala
 305 310 315 320
 Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser
 325 330 335
 Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr
 340 345 350
 Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala
 355 360 365
 Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr
 370 375 380
 Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro
 385 390 395 400
 Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr
 405 410 415
 Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg
 420 425 430
 Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu
 435 440 445
 Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His
 450 455 460
 Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys
 465 470 475 480

【0088】配列番号：4

配列の長さ：1443

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムDNA

配列

ATG AAT AAA CAT TTA TTA GCA AAA ATC ACT CTT TTA GGT GCT GCA CAA 48
 Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln
 1 5 10 15
 CTA TTT ACG TTT CAT ACG GCA TTT GCA GAT ATA CCT CTG ACA CCT GCT 96
 Leu Phe Thr Phe His Thr Ala Phe Ala Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala
 20 25 30
 CAG TTC GCA AAA GCG AAA ACA GAA AAT TTT GAT AAA AAA GTG ATT CTG 144
 Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr Glu Asn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu
 35 40 45
 TCC AAT TTA AAT AAA CCA CAT GCT TTG TTA TGG GGG CCA GAT AAT CAA 192
 Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln
 50 55 60
 ATT TGG TTA ACC GAA CGT GCA ACT GGC AAA ATT TTA AGA GTA AAT CCT 240
 Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro

起源

生物名：アシネットバクター・バウマンニ (Acinetobacter baumannii)

株名：JCM6841

65	70	75	80
GTA TCT GGT AGC GCG AAA ACA GTA TTT CAG GTT CCT GAA ATT GTG AGT 288			
Val	Ser	Gly	Ser
Ala	Lys	Thr	Val
Phe	Gln	Val	Pro
Glu	Ile	Val	Ser
85	90	95	
GAT GCT GAT GGG CAA AAt GGT TTG TTA GGT TTT GCT TTT CAT CCT GAC 336			
Asp	Ala	Asp	Gly
Gln	Asn	Gly	Leu
Leu	Gly	Phe	Ala
His	Pro	Phe	His
Asp			
100	105	110	
TTT AAA CAT AAC CCT TAT ATC TAT ATT TCA GGC ACT TTT AAA AAT CCA 384			
Phe	Lys	His	Asn
Pro	Tyr	Ile	Tyr
Ile	Ser	Gly	Thr
Phe	Lys	Asn	Pro
115	120	125	
AAA TCT ACA GAT AAA GAG TTA CCT AAT CAG ACA ATT ATT CGT AGA TAT 432			
Lys	Ser	Thr	Asp
Lys	Glu	Leu	Pro
Asn	Gln	Thr	Ile
Gln	Ile	Arg	Arg
130	135	140	
ACC TAT AAT AAA ACT ACA GAT ACA TTT GAA AAG CCT ATT GAT TTG ATT 480			
Thr	Tyr	Asn	Lys
Thr	Asp	Thr	Phe
Glu	Lys	Pro	Ile
Asp	Leu	Ile	
145	150	155	160
GCA GGT TTA CCG TCA TCA AAA GAT CAT CAG TCT GGT CGT CTC GTT ATT 528			
Ala	Gly	Leu	Pro
Pro	Ser	Ser	Lys
Lys	Asp	His	Gln
Gln	Ser	Gly	Arg
Arg	Ile	Leu	
165	170	175	
GGT CCA GAC CAA AAA ATC TAC TAT ACG ATT GGT GAC CAA GGT CGT AAT 576			
Gly	Pro	Asp	Gln
Lys	Ile	Tyr	Tyr
Ile	Gly	Asp	Gln
Gly	Arg	Gly	Asn
180	185	190	
CAG TTA GCT TAT CTA TTC TTA TCG AAT CAG GCA CAG CAT ACT CCG ACT 624			
Gln	Leu	Ala	Tyr
Leu	Phe	Leu	Ser
Asn	Gln	Ala	Gln
His	Thr	Pro	Thr
195	200	205	
CAG CAA GAG CTC AAT AGT AAA GAC TAC CAT ACA TAT ATG GGT AAA GTA 672			
Gln	Gln	Glu	Leu
Asn	Ser	Lys	Asp
Tyr	His	Thr	Tyr
Met	Gly	Lys	Val
210	215	220	
TTA CGC TTA AAT CTG GAC GGC AGT ATA CCT AAA GAC AAC CCA AGC TTT 720			
Leu	Arg	Leu	Asn
Leu	Asp	Gly	Ser
Ile	Pro	Lys	Asp
Asn	Pro	Ser	Phe
225	230	235	240
AAC GGC GTA GTG AGT CAT ATC TAC ACT TTA GGG CAC CGT AAT CCA CAA 768			
Asn	Gly	Val	Val
Ser	His	Ile	Tyr
Thr	Leu	Gly	His
Arg	Asn	Pro	Gln
245	250	255	
GGT TTA GCA TTT GCC CCA AAT GGA AAG CTT TTA CAA TCT GAG CAA GGG 816			
Gly	Leu	Ala	Phe
Ala	Pro	Gly	Lys
Leu	Leu	Gln	Ser
Glu	Gln	Gly	Gly
260	265	270	
CCA AAT TCT GAT GAT GAA ATT AAC CTT GTA TTA AAA GGT GGT AAC TAT 864			
Pro	Asn	Ser	Asp
Asp	Glu	Ile	Asn
Leu	Val	Leu	Lys
Gly	Gly	Gly	Asn
275	280	285	
GGC TGG CCA AAT GTA GCT GGT TAT AAA GAT GAC AGT GGT TAT GCC TAT 912			
Gly	Trp	Pro	Asn
Asn	Val	Ala	Gly
Tyr	Lys	Asp	Ser
Gly	Tyr	Asp	Gly
290	295	300	
GCA AAC TAT TCG GCA GCA ACC AAT AAA TCA CAA ATT AAA GAT TTA GCT 960			
Ala	Asn	Tyr	Ser
Ala	Ala	Ala	Thr
Asn	Lys	Ser	Gln
Ile	Lys	Asp	Leu
305	310	315	320
CAA AAC GGG ATA AAA GTA GCA ACA GGT GTT CCT GTG ACT AAA GAG TCT 1008			
Gln	Asn	Gly	Ile
Lys	Val	Ala	Thr
Gly	Val	Gly	Val
Asp	Pro	Val	Thr
Ser	Glu	Lys	
325	330	335	
GAA TGG ACT GGT AAA AAC TTT GTG CCA CCT TTG AAA ACT TTA TAT ACG 1056			

Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr
 340 345 350
 GTA CAA GAT ACC TAT AAC TAT AAT GAC CCT ACT TGT GGT GAG ATG GCA 1104
 Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala
 355 360 365
 TAT ATT TGC TGG CCA ACG GTT GCA CCG TCA TCG GCA TAT GTA TAT ACG 1152
 Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr
 370 375 380
 GGA GGC AAA AAA GCG ATT CCA GGG TGG GAA AAT ACA TTA TTG GTC CCA 1200
 Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro
 385 390 395 400
 TCT TTA AAA CGT GGG GTG ATT TTC CGT ATT AAA TTG GAC CCG ACA TAT 1248
 Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr
 405 410 415
 AGC ACG ACT TTG GAT GAT GCT ATC CCA ATG TTT AAA AGC AAT AAC CGT 1296
 Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg
 420 425 430
 TAT CGT GAT GTC ATC GCT AGT CCA GAA GGT AAT ACC TTA TAT GTG CTG 1344
 Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu
 435 440 445
 ACT GAT ACA GCG GGA AAT GTA CAA AAA GAT GAT GGT TCA GTC ACT CAT 1392
 Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His
 450 455 460
 ACT TTA GAG AAT CCC GGT TCT CTC ATT AAA TTT ACA TAT AAC GGT AAG 1440
 Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys
 465 470 475 480
 TAA 1443

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6 識別記号 F I
 C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 N 1/21
 C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 N 15/09 Z N A
 C 1 2 R 1:01)

(72) 発明者 足立 収生
 山口県山口市芝崎町2番2-204

(72) 発明者 松下 一信
 山口県山口市吉敷2645-27

(19) [Issuing Country] Japanese Patent Office (JP)

(12) [Publication Type] Official Kokai Patent Report (A)

(11) [Publication Number] Patent Publication

1999 - 243949

(43) [Publication Date] September 14, 1999

(54) [Title of Invention] DESIGNATE PQQ AS SUPPLEMENTARY MOLECULE FAMILY
GLUCOSE DEHYDROGENASE AND ITS MANUFACTURING METHOD

(51) [International Patent Classification 6th Edition] C12N 9/04 1/21

9/96 15/09 ZNA // (C12N 9/04 C12R 1:19)

(C12N 1/21 C12R 1:19) (C12N 15/09 ZNA C12R 1:01)

[F I] C12N 9/04 D 1/21 9/96 15/00 ZNA A

[Request for Examination] Examination not requested

[Number of Claims] 3 4

[Form of Application] O L

[Number of Pages in Document] 18

(21) [Application Number] Japan Patent Application 1998-50817

(22) [Application Date] March 3, 1998

(71) [Applicant]

[Applicant Code] 00000 31 60

[Name] TOYOBO CO. LTD. (DB 69-053-8160)

[Address] Osaka Prefecture Osaka City Kita-ku Dojimahama 2-2-8

(72) [Inventor]

[Name] Seiji Takeshima

[Address] Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) Tsuruga Bio-research Laboratory Toyo-cho 10-24 Tsuruga City Fukui Prefecture

(72) [Inventor]

[Name] Shizuo Hattori

[Address] Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) Tsuruga Bio-research Laboratory Toyo-cho 10-24 Tsuruga City Fukui Prefecture

(72) [Inventor]

[Name] Yoshihisa Kawamura

[Address] Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) Tsuruga Bio-research Laboratory Toyo-cho 10-24 Tsuruga City Fukui Prefecture

(72) [Inventor]

[Name] Shusei Adachi

[Address] Shibasaki 2-2 – 204 Yamaguchi City Yamaguchi Prefecture

(72) [Inventor]

[Name] Kazunobu Matsushita

[Address] Yoshiki 2645 – 27 Yamaguchi City Yamaguchi Prefecture

(57) [Abstract]

[Problem] With gene recombination technology, furthermore glucose dehydrogenase, which designates PQQ of the large amount as supplementary molecule family, is offered at a low cost.

[Means of Solution] Installing DNA fragment which includes gene which glucose dehydrogenase which designates PQQ as supplementary molecule family code is done the glucose dehydrogenase and its manufacturing method which designate PQQ which cultures the transformed host which it acquires by microorganism which possesses PQQ production ability with the recombinant vector which becomes transformation doing recovers from said culture as supplementary molecule family.

[Scope of Claim(s)]

[Claim 1] Glucose dehydrogenase which designates PQQ, a protein of (a) or (b) below as supplementary molecule family.

(A) It consists of amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 1 protein

(B) In amino acid sequence (a), amino acid sequence of 1 or several is deficient, consists of amino acid sequence which it is substituted or is added, at the same time possesses glucose dehydrogenase activity protein

[Claim 2] Glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein which consists of

amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 1 as supplementary molecule family.

[Claim 3] Below (e) or glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein of the (f) as supplementary molecule family.

(E) It consists of amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 3 protein

(F) In amino acid sequence (e), amino acid sequence of 1 or several is deficient, consists of amino acid sequence which it is substituted or is added, at the same time possesses glucose dehydrogenase activity protein

[Claim 4] Glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein which consists of amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 3 as supplementary molecule family.

(A) It consists of amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 1 protein

(B) In amino acid sequence (a), amino acid sequence of 1 or several is deficient, consists of amino acid sequence which it is substituted or is added, at the same time possesses glucose dehydrogenase activity protein

[Claim 6] The glucose dehydrogenase gene, which designates PQQ, a protein consisting of amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 1 as a supplementary molecule family code is done.

[Claim 7] Below (c) or gene which glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a

protein of (d) as supplementary molecule family code is done.

(C) It consists of base sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 2 DNA

(D) At time of arranging above-mentioned (c), base of the 1 or several to be deficient, be substituted or added, protein which at same time possesses glucose dehydrogenase activity code is done DNA

[Claim 8] Gene which glucose dehydrogenase which designates PQQ which possesses the DNA which consists of base sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 2 as a supplementary molecule family code is done.

[Claim 9] Below (e) or gene which glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein of (f) as supplementary molecule family code is done.

(E) It consists of amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 3 protein

(F) In amino acid sequence (e), amino acid sequence of 1 or several is deficient, consists of amino acid sequence which it is substituted or is added, at the same time possesses glucose dehydrogenase activity protein

[Claim 10] The glucose dehydrogenase gene, which designates PQQ, a protein consisting of amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 3 as a supplementary molecule family code is done.

[Claim 11] Below (g) or gene which glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein of (h) as supplementary molecule family code is done.

(G) It consists of base sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 4 DNA

(H) At time of arranging above-mentioned (g), base of the 1 or several to be deficient, be substituted or added, protein which at same time possesses glucose dehydrogenase activity code is done DNA

[Claim 12] The glucose dehydrogenase gene, which designates PQQ, which possesses the DNA consisting of base sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 4 as a supplementary molecule family code is done.

[Claim 13] Recombinant vector, which contains gene which glucose dehydrogenase that designates the PQQ, which is stated in any of Claim 5 to 12 as supplementary molecule family code, is done.

[Claim 14] Recombinant vector which is stated in Claim 13 which designates that it can duplicate in microorganism where code is done DNA fragment which includes gene which is installed glucose dehydrogenase which designates the PQQ as supplementary molecule family, at same time possesses the PQQ production ability as feature.

[Claim 15] Transformed host which microorganism, which possesses PQQ production ability with recombinant vector, stated in Claim 13 or 14 transformations is done.

[Claim 16] Transformed host which is stated in Claim 15 where glucose dehydrogenase which designates PQQ as supplementary molecule family is *Acinetobacter* * *cull core* *acinetobacter* (*Acinetobacter calcoaceticus*) or *Acinetobacter* * *Baumann Ni* (*Acinetobacter baumannii*) derivation.

[Claim 17] Transformed host which is stated in Claim 15 which is a microorganism where the microorganism which possesses PQQ production ability belongs to *Pseudomonas*

(Pseudomonas) being attached or Acinetobacter (Acinetobacter) being attached.

[Claim 18] Microorganism which possesses PQQ production ability Pseudomonas * AERUGINOSA (Pseudomonas aeruginosa), Pseudomonas * fluorescence (Pseudomonas fluorescens), the Pseudomonas putida (Pseudomonas putida) and Acinetobacter * cull core ceticus (Acinetobacter calcoaceticus), from group which consists of the Acinetobacter * Baumann Ni (Acinetobacter baumannii) transformed host which is stated in Claim 15 which is a microorganism which is chosen.

[Claim 19] Transformed host, which is stated in Claim 17 where microorganism, which possesses the PQQ production ability, is Pseudomonas putida (Pseudomonas putida).

[Claim 20] Transformed host which is stated in Claim 17 where microorganism which possesses the PQQ production ability is Acinetobacter * cull core ceticus (Acinetobacter calcoaceticus) or Acinetobacter * Baumann Ni (Acinetobacter baumannii).

[Claim 21] Transformed host, which is stated in Claim 19, or 20 where glucose dehydrogenase, which designates PQQ as supplementary molecule family, is soluble.

[Claim 22] Installing DNA fragment which includes gene which glucose dehydrogenase which designates PQQ as supplementary molecule family code is done the microorganism which possesses PQQ production ability with recombinant vector which becomes culturing transformed microorganism which transformation is done, glucose dehydrogenase which designates PQQ as supplementary molecule family from said culture the manufacturing method of glucose dehydrogenase which recovers.

[Claim 23] Manufacturing method of glucose dehydrogenase which is stated in Claim 22 where glucose dehydrogenase, which designates PQQ as supplementary molecule family, is a

microorganism of *Acinetobacter* * *cull core ceticus* (*Acinetobacter calcoaceticus*) or *Acinetobacter* * *Baumann Ni* (*Acinetobacter baumannii*) derivation.

[Claim 24] Manufacturing method of glucose dehydrogenase, which is stated in Claim23 which is a microorganism where microorganism, which possesses PQQ production ability, belongs to *Pseudomonas* (*Pseudomonas*) being attached or *Acinetobacter* (*Acinetobacter*) being attached.

[Claim 25] Microorganism which possesses PQQ production ability *Pseudomonas* * *AERUGINOSA* (*Pseudomonas aeruginosa*), *Pseudomonas* * fluorescence (*Pseudomonas fluorescens*), the *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*) and *Acinetobacter* * *cull core ceticus* (*Acinetobacter calcoaceticus*), from group which consists of the *Acinetobacter* * *Baumann Ni* (*Acinetobacter baumannii*) manufacturing method of glucose dehydrogenase which is stated in Claim23 which is a microorganism which is chosen.

[Claim 26] Manufacturing method of glucose dehydrogenase stated in Claim23 where microorganism, which possesses PQQ production ability, is *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*).

[Claim 27] Manufacturing method of glucose dehydrogenase which is stated in Claim23 where microorganism which possesses PQQ production ability is *Acinetobacter* * *cull core ceticus* (*Acinetobacter calcoaceticus*) or *Acinetobacter* * *Baumann Ni* (*Acinetobacter baumannii*).

[Claim 28] Manufacturing method of glucose dehydrogenase, which is stated in Claim 26 or 27 where glucose dehydrogenase, which designates PQQ as supplementary molecule family is soluble.

[Claim 29] Lyophilizing doing glucose dehydrogenase which designates PQQ as supplementary molecule family under existing of buffer of GOOD, stabilization method of the glucose dehydrogenase which designates that one keep as feature.

[Claim 30] Stabilization method of glucose dehydrogenase, which is stated in Claim 29 where calcium coexists.

[Claim 31] From group where buffer of GOOD consists of PIPES, the MES and MOPS stabilization method of glucose dehydrogenase stated in the Claim 30 or 31 which is a buffer which is chosen.

[Claim 32] Lyophilizing doing glucose dehydrogenase which designates PQQ as supplementary molecule family under existing of buffer of GOOD, glucose dehydrogenase composite which designates that it is something which is kept as feature and is stabilized.

[Claim 33] It stated in Claim 32 where calcium coexists glucose dehydrogenase composite.

[Claim 34] From group where buffer of GOOD consists of PIPES, the MES and MOPS glucose dehydrogenase composite which is stated in Claim 32 or 33 which is a buffer which is chosen.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Technological Field of Invention] This invention novel glucose dehydrogenase which designates PQQ as supplementary molecule family (Below, also GDH calls), installing gene fragment which gene and said GDH which the said GDH code are done code is done, microorganism which possesses PQQ production ability with recombinant vector and said

recombinant vector which become regards the GDH composite which is stabilized manufacturing method of GDH due to culturing the transformed host and said transformed host which transformation are done, by stabilization method and the said stabilization method of GDH.

[0002]

[Current Technology] GDH was discovered in 1959 year as enzyme, which possesses the quinone compound of unknown with J.G. Hauge of Norway. On one hand, as for PQQ (Pyrrolo Quinoline Quinone) chemical structure is decided in 1979 as the third coenzyme of dehydrogenase, methanol dehydration element enzyme of methanol-feeding microbe and alcohol dehydrogenase and glucose dehydrogenase of acetic acid bacteria in center, existence is verified with dehydrogenase in many organism, mainly.

[0003] Because these dehydrogenase can reduce artificial electron acceptor, when dye like the nitro blue tetrazolium is used with visible light, furthermore sensitivity it can detect well, and like NAD dependency dehydrogenase not to be equilibrium reaction, because it is a reaction to one direction, it is assumed that quite it is useful in quantification of the compound of trace amount, (Candy crest actual and Methods in Enzymology (0076-6879) Vol.89, 20(1982)).

[0004] Fact that usefulness is highest in enzyme, which designates the PQQ as supplementary molecule family, is PQQ dependency GDH, one can use for the measurement of blood glucose. In regard to actual use, it is possible as for use as conventional biochemistry reagent the staining reaction of dry reagent, which of course, is locked in film and the sensor application equal width, which is locked in chip to apply widely. By comparison with glucose oxidase and NAD (P) dependency GDH which operate in the same way to glucose, influence of dissolved

oxygen is not received, reaction because of simple what simply, furthermore can designate device as inexpensive is feature.

[0005] Cloning of GDH which designates above-mentioned PQQ as a supplementary molecule family *Acinetobacter* * *cull core ceticus* (*Acinetobacter calcoaceticus*) L MD 79.41 (A. -M. Cleton-Jansen and others, *Journal of Bacteriology* (0021-9193, JOBAAY), 170,2121(1988) and *Molecular & General Genetics* (0026-8925, MGGEAE), 217,430(1989)), *Escherichia coli* (*Escherichia coli*) (A. -M. Cleton-Jansen and others and *Journal of Bacteriology* (0021-9193, JOBAAY), 172,6308(1990)), is reported with *Gluconobacter* * *oxydans* (*Gluconobacter oxydans*)(*Molecular & General Genetics* (0026-8925, MGGEAE) ,229,206(1991)) etc, also revelation with *E. coli* is verified.

[0006]

[Problems to be Solved by the Invention] Being analyzed by genetic well, to be, At same time as host which transformation is done optimization as for the intestinal bacteria which begins *E. coli* which is done being known that the PQQ is not produced, to be, Installing gene fragment which GDH which designates PQQ as a supplementary molecule family code is done, transformation it does the *E. coli* with vector which becomes, cultures said *E. coli* and only the Apo type GDH which does not have activity it is known that it cannot acquire. These Apo type GDH are convertible in hollow type GDH that has the activity by adding PQQ from outside, but PQQ which is needed is expensive very as reagent. In addition, with industrially scale it is verified that all Apo type is not converted to hollow type.

[0007] In addition, when culturing transformation *E. coli* in *Biotechnol. Lett.* 16,12,1265(1994) , it is reported to the culture medium that hollow type GDH which has activity including the

PQQ is produced, but in this case it is necessary to use expensive PQQ for large amount.

Furthermore, installing gene fragment which GDH of *Gluconobacter oxydans* the code is done in chromosome of *Gluconobacter oxydans* itself, it has revealed in Molecular & General Genetics (0026-8925, MGGEAE), 229,206(1991), but in this case it exists on chromosome, because they are not multistory, amount of expression is small.

[0008]

[Means of Solving the Problems] As for these inventors in order to achieve above-mentioned object the various was examined as for result which, Installing DNA fragment which includes gene which GDH which designates PQQ as supplementary molecule family code is done it cultures transformed microorganism which it acquires by microorganism which possesses the PQQ production ability with recombinant vector which becomes transformation doing, GDH which designates PQQ as supplementary molecule family from said culture by recovering, in inexpensive one discovered fact that mass production it is possible, GDH arrived in this invention.

[0009] Namely, this invention installing DNA fragment which includes gene which the GDH which designates PQQ as supplementary molecule family the code is done culturing transformed microorganism which designates that it is acquired by transformation doing microorganism which with recombinant vector which possesses PQQ production ability as feature, GDH which designates PQQ as supplementary molecule family from culture is manufacturing method of GDH which is made thing feature which recovers.

[0010] This invention is glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein of the (a) or (b) below as supplementary molecule family.

(A) It consists of amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 1 protein

(B) In amino acid sequence (a), amino acid sequence of 1 or several is deficient, consists of amino acid sequence which it is substituted or is added, at the same time possesses glucose dehydrogenase activity protein

This invention is glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein which consists of amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 1 as a supplementary molecule family.

[0011] This invention below (e) or is glucose dehydrogenase which designates the PQQ which is a protein of (f) as supplementary molecule family.

(E) It consists of amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 3 protein

(F) In amino acid sequence (e), amino acid sequence of 1 or several is deficient, consists of amino acid sequence which it is substituted or is added, at the same time possesses glucose dehydrogenase activity protein

This invention is glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein which consists of amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 3 as a supplementary molecule family.

[0012] This invention is gene which glucose dehydrogenase, which designates PQQ, which is a protein of (a) or (b) below as supplementary molecule family code is done.

(A) It consists of amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 1

protein

(B) In amino acid sequence (a), amino acid sequence of 1 or several is deficient, consists of amino acid sequence which it is substituted or is added, at the same time possesses glucose dehydrogenase activity protein

This invention is gene which glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein which consists of amino acid sequence which is stated in the sequence table * Sequence Number 1 as supplementary molecule family code is done.

[0013] This invention below (c) or is gene which glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein of (d) as supplementary molecule family code is done.

(C) It consists of base sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 2 DNA

(D) At time of arranging above-mentioned (c), base of the 1 or several to be deficient, be substituted or added, protein which at same time possesses glucose dehydrogenase activity code is done DNA

This invention is gene which glucose dehydrogenase which designates PQQ which possesses DNA which consists of base sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 2 as supplementary molecule family code is done.

[0014] This invention below (e) or is gene which glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein of (f) as supplementary molecule family code is done.

(E) It consists of amino acid sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 3 protein

(F) In amino acid sequence (e), amino acid sequence of 1 or several is deficient, consists of

amino acid sequence which it is substituted or is added, at the same time possesses glucose dehydrogenase activity protein

This invention is gene which glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein which consists of amino acid sequence which is stated in the sequence table * Sequence Number 3 as supplementary molecule family code is done.

[0015] This invention below (g) or is gene which glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein of (h) as supplementary molecule family code is done.

(G) It consists of base sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 4 DNA

(H) At time of arranging above-mentioned (g), base of the 1 or several to be deficient, be substituted or added, protein which at same time possesses glucose dehydrogenase activity code is done DNA

This invention is gene which glucose dehydrogenase which designates PQQ which possesses DNA which consists of base sequence which is stated in sequence table * Sequence Number 4 as supplementary molecule family code is done.

[0016] This invention is recombinant vector, which contains gene which glucose dehydrogenase, which designates above-mentioned PQQ as supplementary molecule family, the code is done. It is an above-mentioned recombinant vector which designates that it can duplicate in microorganism where as for this invention, code is done DNA fragment which includes gene which is installed glucose dehydrogenase which designates the PQQ as supplementary molecule family, at same time possesses the PQQ production ability as feature.

[0017] This invention is transformed host which microorganism, which possesses PQQ

production ability with the above-mentioned recombinant vector transformation, is done. This invention is above-mentioned transformed host where glucose dehydrogenase, which designates PQQ as supplementary molecule family, is *Acinetobacter* * *cull core ceticus* (*Acinetobacter calcoaceticus*) or *Acinetobacter* * *Baumann Ni* (*Acinetobacter baumannii*) derivation. This invention is above-mentioned transformed host, which is a microorganism where the microorganism, which possesses PQQ production ability, belongs to *Pseudomonas* (*Pseudomonas*) being attached or *Acinetobacter* (*Acinetobacter*) being attached.

[0018] As for this invention, microorganism which possesses PQQ production ability *Pseudomonas* * *AERUGINOSA* (*Pseudomonas aeruginosa*), *Pseudomonas* * fluorescence (*Pseudomonas fluorescens*), *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*) and *Acinetobacter* * *cull core ceticus* (*Acinetobacter calcoaceticus*), is the above-mentioned transformed host which is a microorganism which is chosen from group which consists of *Acinetobacter* * *Baumann Ni* (*Acinetobacter baumannii*). This invention is above-mentioned transformed host where microorganism, which possesses the PQQ production ability, is *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*). This invention is above-mentioned transformed host where microorganism which possesses the PQQ production ability is *Acinetobacter* * *cull core ceticus* (*Acinetobacter calcoaceticus*) or *Acinetobacter* * *Baumann Ni* (*Acinetobacter baumannii*). This invention is above-mentioned transformed host where glucose dehydrogenase, which designates PQQ as supplementary molecule family, is solubility.

[0019] This invention installing DNA fragment which includes gene which the glucose dehydrogenase which designates PQQ as supplementary molecule family the code is done microorganism which with recombinant vector which becomes possesses the PQQ production ability culturing transformed microorganism which transformation is done, glucose

dehydrogenase which designates PQQ as supplementary molecule family from said culture is the manufacturing method of glucose dehydrogenase which recovers.

[0020] This invention is manufacturing method of above-mentioned glucose dehydrogenase where glucose dehydrogenase, which designates PQQ as supplementary molecule family is microorganism of *Acinetobacter* * *cull core ceticus* (*Acinetobacter calcoaceticus*) or *Acinetobacter* * *Baumann Ni* (*Acinetobacter baumannii*) derivation. This invention is manufacturing method of above-mentioned glucose dehydrogenase, which is a microorganism where microorganism, which possesses PQQ production ability, belongs to *Pseudomonas* (*Pseudomonas*) being attached or *Acinetobacter* (*Acinetobacter*) being attached.

[0021] As for this invention, microorganism which possesses PQQ production ability *Pseudomonas* * *AERUGINOSA* (*Pseudomonas aeruginosa*), *Pseudomonas* * fluorescence (*Pseudomonas fluorescens*), *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*) and *Acinetobacter* * *cull core ceticus* (*Acinetobacter calcoaceticus*), is manufacturing method of the above-mentioned glucose dehydrogenase which is a microorganism which is chosen from group which consists of *Acinetobacter* * *Baumann Ni* (*Acinetobacter baumannii*). This invention is manufacturing method of above-mentioned glucose dehydrogenase where microorganism, which possesses PQQ production ability, is *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*). This invention is manufacturing method of above-mentioned glucose dehydrogenase where microorganism which possesses PQQ production ability is *Acinetobacter* * *cull core ceticus* (*Acinetobacter calcoaceticus*) or *Acinetobacter* * *Baumann Ni* (*Acinetobacter baumannii*). This invention is manufacturing method of above-mentioned glucose dehydrogenase where glucose dehydrogenase, which designates PQQ as supplementary molecule family, is

solubility.

[0022] This invention lyophilizing doing glucose dehydrogenase which designates PQQ as a supplementary molecule family under existing of buffer of GOOD, is stabilization method of glucose dehydrogenase which designates that one keep as feature. This invention is stabilization method of above-mentioned glucose dehydrogenase where calcium coexists. This invention is stabilization method of above-mentioned glucose dehydrogenase, which is a buffer, which is chosen from group where buffer of GOOD consists of PIPES, MES and MOPS.

[0023] It is a glucose dehydrogenase composite where this invention lyophilizing doing glucose dehydrogenase, which designates PQQ as supplementary molecule family under existing of the buffer of GOOD, designates that, it is something, which is kept as a feature and is stabilized. This invention is above-mentioned glucose dehydrogenase composite where calcium coexists. This invention is above-mentioned glucose dehydrogenase composite which is a buffer, which is chosen from group where buffer of GOOD consists of the PIPES, MES and MOPS.

[0024]

[Form of Implementing the Invention] Code is done DNA fragment, which includes gene, which can acquire the GDH that designates PQQ of this invention as supplementary molecule family from GDH producing microbe. As said GDH producing microbe, specifically, for example *Acinetobacter* * *cull core ceticus*, *Acinetobacter* * *Baumann Ni* (*Acinetobacter baumannii*), *Pseudomonas* * *aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*), *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*), *Pseudomonas* * *fluorescence* (*Pseudomonas fluorescens*),

Gluconobacter * oxydans or other oxidation bacteria and Agrobacterium radiobacter, the Escherichia coli and Klebsiella aerogenes or other intestinal bacteria can be listed. Acinetobacter * cull core ceticus or solubility GDH of Acinetobacter * Baumann Ni are desirable even among them.

[0025] It is possible also to be possible to extract gene, which the said GDH code is done from these strain, in addition in chemical to synthesize. Furthermore, also it is possible to obtain DNA fragment, which includes the glucose dehydrogenase gene, which designates PQQ as supplementary molecule family with utilization of PCR method.

[0026] Code is done above-mentioned GDH as gene which, amino acid sequence of 1 or several is deficient in gene or the (b) amino acid sequence (a) which protein which consists of amino acid sequence which is stated in for example (a) sequence table * Sequence Number 1 code is done, consists of amino acid sequence which it is substituted or is added and, code is done gene which can list glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein which at the same time possesses glucose dehydrogenase activity as supplementary molecule family.

[0027] In addition, amino acid sequence of 1 or several is deficient in the gene or (f) amino acid sequence (e) which protein which consists of amino acid sequence which is stated in (e) sequence table * Sequence Number 3 code is done, consists of the amino acid sequence which it is substituted or is added and, code is done also the gene which can list glucose dehydrogenase which designates PQQ which is a protein which at same time possesses glucose dehydrogenase activity as supplementary molecule family.

[0028] Furthermore, at time of arranging DNA or (d) above-mentioned (c) which consists of

base sequence which is stated in the(c) sequence table * Sequence Number 2, base of 1 or several to be deficient, be substituted or added, there is a DNA which protein which at the same time possesses glucose dehydrogenase activity code has been done.

[0029] Furthermore, at time of arranging DNA or (h) above-mentioned (g) which consists of base sequence which is stated in the (g) sequence table * Sequence Number 4, base of 1 or several to be deficient, be substituted or added, there is a DNA which protein which at the same time possesses glucose dehydrogenase activity code has been done.

[0030] Regarding to this invention, one can list next kind of method as the method, which obtains gene, which code it, does GDH. The linear expression vector and in blunt end or attached end of both DNA, connecting closing DNA ligase etc which cut off DNA separation and purification after doing chromosome of, for example, *Acinetobacter* * *cull core ceticus N* CIB 11517, making use of ultrasonic treatment and restriction enzyme treatment etc with it constructs recombinant vector. After importing said recombinant vector to replicatable host microorganism, screening doing with marker of vector and revelation of enzyme activity as index, one obtain the microorganism which keeps recombinant vector which contains gene which the GDH which designates PQQ as supplementary molecule family the code is done.

[0031] Next, culturing microorganism which keeps above-mentioned recombinant vector, the separation and purification it does said recombinant vector from cell mass of said culture microorganism, the gene which code it does GDH it can recover from said expression vector. Chromosomal DNA of *Acinetobacter* * *cull core ceticus N* CIB 11517 which is a for example gene donor specifically recovers like below.

[0032] For example 1 to 3-day period stirred culture doing said gene provision microorganism,

microbe collection it does fermentation broth which it acquires with centrifugal separation, it can manufacture content lysisones of GDH gene which designates PQQ as supplementary molecule family by next, lysis doing this. As method of lysis, treatment is administered by, for example, lysozyme or other bacteriolytic enzyme, the according to need protease and other enzyme and sodium lauryl sulfate (SDS) or other surfactant are jointly used. Furthermore, combining with physical fragmenting method like freezing, thawing, and French press treatment it is good.

[0033] Separation and purification to do DNA from lysis ones which it acquires as description above, following to conventional method, it is possible to do deproteination treatment and ribonuclease treatment and alcohol precipitation treatment or other method due to, for example, phenol treatment and protease treatment due to appropriate combination especially.

[0034] To do with, for example, ultrasonic treatment and restriction enzyme treatment etc it is possible method, which cuts off DNA which separation, and purification is done, from microorganism. Type II restriction enzyme which operates preferably specific nucleotide sequence is suitable.

[0035] When cloning, those constructed can multiply which autonomously inside host microorganism as vector, phages or as one for gene recombination from plasmid are suitable. As phages, when, for example, Escherichia coli is designated as host microorganism, Lambda gt10 and the Lambda gt11 etc are illustrated. In addition, when, for example, Escherichia coli is designated as host microorganism as plasmid, the pBR322, pUC19 and pBluescript etc are illustrated.

[0036] Case of cloning, as description above cutting off with restriction enzyme which is used

for cutting of microorganism DNA which is a gene donor which the GDH which vector, description above is done code is done, it can acquire vector fragment, but as restriction enzyme which always is used for cutting of said microorganism DNA it is not necessary to use same restriction enzyme. If method which connects with microorganism DNA fragment and vector DNA fragment should have been method which uses DNA ligase of public knowledge, after annealing of attached end of for example microorganism DNA fragment and attached end of vector fragment, with use of the suitable DNA ligase recombinant vector of microorganism DNA fragment and vector DNA fragment draws up. After responding to need and annealing, importing to host microorganism, it is possible also to produce recombinant vector making use of DNA ligase of the inside the body.

[0037] If recombinant vector is stability as host microorganism, which is used for cloning, at the same time character of adventitious gene is something, which can be revealed with autonomously replicatable, especially it is not restricted. Generally, Escherichia coli W 31 10 , Escherichia coli C600, Escherichia coli HB101 , Escherichia coli JM109 and Escherichia coli DH5 α etc can be used.

[0038] When for example host microorganism is Escherichia coli as method, which imports recombinant vector to the host microorganism, competent cell method and electroporesis method etc due to calcium treatment can be used.

[0039] As description above microorganism, which is a transformed host that is acquired, can produce GDH of large amount in stability by being cultured with the nutrient culture medium. If selection concerning presence or absence of importation of object recombinant vector to the host microorganism should have searched microorganism which reveals GDH activity

simultaneously with drug resistance marker of vector which keeps DNA which is made object and addition of PQQ. One grow with selective media which is based on for example drug resistance marker and if one should have selected microorganism which at same time forms GDH.

[0040] Reading it did base sequence of GDH gene which designates PQQ which is acquired with above-mentioned method as supplementary molecule family, with dideoxy method which is stated in Science , 2nd Vol.14 ,1205(1981). In addition, amino acid sequence of GDH as description above presumed from the base sequence that is decided.

[0041] As description above, one time from recombinant vector which possesses the GDH gene which designates PQQ which is selected as supplementary molecule family, importation to recombinant vector which can be duplicated with the microorganism which possesses PQQ production ability with restriction enzyme and PCR method is a GDH gene by can recover, connecting DNA which with other vector fragment from recombinant vector which keeps GDH gene easily can execute. In addition, transformation of microorganism, which possesses PQQ production ability due to these vectors, can use competent cell method and electroporesis method etc due to calcium treatment.

[0042] Methylobacterium being attached or other methanol assimilation bacteria , Acetobacter being attached and Gluconobacter being attached acetic acid bacteria , Flavobacterium being attached, the Pseudomonas sp. and Acinetobacter or other bacteria can be listed as microorganism, which possesses the PQQ production ability. host-vector system which can utilize Pseudomonas microbe and Acinetobacter bacteria to be established even among them, because it is easy to utilize, it is desirable.

[0043] With Pseudomonas microbe, Pseudomonas * AERUGINOSA, Pseudomonas * fluorescence and Pseudomonas putida etc can be used. In addition, with Acinetobacter bacteria Acinetobacter * cull core ceticus and Acinetobacter * Baumann Ni etc can be used.

[0044] Vector of RSF1010 is useable derivation or vector, which possesses similar replicon in Pseudomonas microbe as recombinant vector, which can be duplicated with above-mentioned microorganism . (M.M. Bagdasarian and others and Gene (0378-1119, GENED6) ,26,273(1983)) pCN40 and pCN60 etc such as for example pKT240 and pM MB 24 (C.C. Nieto and others and Gene (0378-1119, GENED6) ,87,145(1990)) and pTS1137 etc can be listed. In addition, (Y.Itoh and others and Gene (0378-1119, GENED6) ,36,27(1985)), it can utilize also pNI111 and pNI20C (N.Itoh and others and Journal of Biochemistry (0021-924X, JOBIAO) , 110 ,614(1991)) such as pME290.

[0045] With Acinetobacter bacteria, (W.Minas and others and Applied and Environmental Microbiology (0099-2240, AEMIDF) ,59,2807(1993)), (M.Hu ng er and others and Gene (0378-1119, GENED6) ,87,45(1990)) such as pKT230 and pWH1266 such as pWM43 it is useable as vector.

[0046] Considering nutrition physiological characteristic of host, if culture conditions it should have selected, in many cases it does culture form of host microorganism which is a transformed host, with liquid culture. It is profitable in industrially to do aerated stirred culture.

[0047] As nutrient source of culture medium, those, which, are usually used for the culture of microorganism, can be widely used. If it should have been an assimilated carbon compound as carbon source, for example glucose , sucrose , the lactose , maltose , lactose , molasses and pyruvic acid etc are used. In addition, if it should have been a practical nitrogen compound as

nitrogen source, for example peptone ,the meat extract , yeast extract , casein hydrolysate and soybean lees alkali extraction ones etc are used. In addition, phosphate salt , carbonate , sulfate , magnesium , calcium ,the potassium , iron , manganese , zinc or other salts , specific amino acid and the specific vitamin etc are used according to need.

[0048] Microbe growth does culture temperature, can modify appropriately in the range, which produces GDH, but as description above in case of the microorganism, which possesses PQQ production ability, it is a preferably 20 to 42 °C extent. culture time differs more or less depending upon condition, but selecting the time where GDH reaches to maximum yield, if it should have completed culture in suitable time, it is a 12 to 72 hours extent usually. As for pH of culture medium microbe grows, can modify appropriately in range which produces GDH, but it is a range of preferably pH 6.0 to 9.0 extent.

[0049] That way it recovers, also it is possible to utilize fermentation broth which includes cell mass which produces GDH in culture, but generally, following to conventional method, when GDH exists in culture medium, after separating with GDH-containing solution and microbial cell mass due to filtration and the centrifugal separation etc, it is utilized. When GDH exists inside cell mass, from culture which is acquired with filtration or centrifugal separation or other means cell mass it recovers, next, destroys this cell mass with mechanical method, or lysozyme or other enzymatic method in addition, adding the according to need , EDTA or other chelator and surfactant, solubilizing it does GDH, the separation and recovery it does as aqueous solution.

[0050] GDH-containing solution which it acquires as description above, for example vacuum concentration and film concentration, furthermore if it should have precipitated due to the

fractional precipitation method due to ammonium sulfate , sodium sulfate or other salt precipitation treatment or hydrophilic organic solvent , for example methanol , the ethanol and acetone etc. In addition, also heat treatment and isoelectric point treatment are effective purification means. after that, GDH, which was refined by doing gel filtration ,the adsorption chromatography , ion exchange chromatography and affinity chromatography due to adsorbent or gel filtration agent etc., can be acquired.

[0051] Separation and purification it does gel filtration and DEAE Sepharose CL-6B due to for example Sephadex (Sephadex) gel (Pharmacia bio tech) etc (Pharmacia bio tech), with octyl Sepharose CL-6B (Pharmacia bio tech) or other column chromatography , can acquire purified enzyme standard. As for said purified enzyme standard, purification it is desirable in extent which electrophoresis (SDS - PAGE)shows single band to be done.

[0052] Powdering doing purified enzyme which it acquires as description above, with the for example lyophilizing , vacuum drying and spray dry etc it is possible to circulate. At that occasion, purified enzyme can use those which are been dissolving in the buffer of phosphate buffer , Tris HCl buffer and GOOD. Any preferred things are buffer of GOOD, PIPES, MES or the MOPS buffer especially are desirable even among them. In addition, from GDH it can be stabilized by adding calcium ion or its salt ,and glutamic acid , glutamine , lysine or other amino acids and furthermore blood serum albumin etc.

[0053] One example of GDH which designates PQQ of this invention as the supplementary molecule, has kind of physicochemical properties which is shown below the .

Action : D — glucose + artificial electron acceptor → δ - gluconolactone + reducing type electron acceptor

Heat stability : Approximately 50 °C or below (pH 7. 5, 3 0 min treatment)

PH stability : 3.5 to 8.5 (25 °C and 1 6 hours treatment)

Optimal temperature : Approximately 40 °C

Optimal pH : 7.0

Molecular weight : 50000

[0054] Regarding to this invention, it measures GDH activity, which it makes supplementary molecule family with condition below.

[0055] < reagent >

50 mM PIPES buffer (pH 6.5)

0.2 mM PMS

0.2 mM NTB

30.6 mM glucose

0.1 9 % Triton X - 100

[0056] <Measurement condition> Above-mentioned reagent mixed solution 3 ml with 37 °C after approximately 5 min preparatory heating, leniently after mixing, water 5 min is recorded with the spectrophotometer which is controlled to 37 °C to contrast including the enzyme solution of 0.1 ml, absorbance change of per minute is measured from linear part. blind test below measures absorbance change in same way in place of enzyme solution distilled water in addition to reagent mixed solution. amount of enzyme, which with above-mentioned condition

forms diformazan of the 1/2 μ mol in 1 minute, is designated as 1 unit (U).

[0057]

[Working Example(s)] Below, with Working Example, this invention is explained specifically.

Working Example 1: Separation of chromosomal DNA

Chromosomal DNA of *Acinetobacter* * *cull core ceticus N* CIB 11517 was separated with following method. microbe collection it did the same strain 30 °C and overnight shaking culture after doing, with centrifugal separation (8000 rpm and 10 min) with LB culture medium of 100 ml. Suspension it did in solution 5 ml which includes 20 % sucrose, 50 mM tris / hydrochloric acid buffer (pH 7.6) and 1 mM EDTA, 37 °C and 30 min temperature-holding it did including proteinase K solution (100 mg/ml) of the 1 ml, next, added 10 % lauroyl sarcosine sodium solution of 1 ml.

[0058] It agitated mixed to above-mentioned solution including chloroform * phenol solution (1:1) of the equivalent, divided into water layer and solvent layer with centrifugation of the 10000 rpm and 3 min, fraction collection did water layer. While double layer doing ethanol of 2 times amount gently in said water layer, agitating slowly with glass rod making DNA glass rod be coiled around it and separated. This it melted with tris / hydrochloric acid buffer (pH 8.0; below, TE one briefly describe.) which includes 1 mM EDTA. This after treating, fraction collection it did water layer with chloroform * phenol solution of the equivalent with centrifugal separation, it separated DNA for second time with the above-mentioned method including ethanol of 2 times amount, melted with TE of 2 ml.

[0059] Working Example 2 : Possesses DNA fragment and said DNA fragment which contain gene which the soluble GDH which designates PQQ as supplementary molecule family the code is done manufacturing recombinant vector which

Partial hydrolysis it did DNA $5 \mu \text{g}$ which is acquired with Working Example 1 with the restriction enzyme Sau3AI (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) make), after making fragment above 2 kbp, 16°C and the 1 6-hour reaction doing with pBluescript KS(+) $1 \mu \text{g}$ and T4 DNA ligase (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) make) 1 unit which are cut off with BamHI (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) make), it connected DNA. transformation it did DNA which it connects making use of competent cell (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) make) of Escherichia JM109 . Per DNA $1\mu\text{g}$ which one use approximately 10^5 colony of transformed host acquired.

[0060] Next, 30°C and 2 4 hours it cultured colony which is acquired with LB culture medium which includes $50 \mu \text{g/ml}$ ampicillin, after lysozyme fragmenting, added PQQ, measured soluble GDH activity of said crude enzyme solution. As a result, GDH producing strain, which designates PQQ of 1 strain as a supplementary molecule family, was discovered. insert DNA of approximately 8 kbp existed in plasmid which said strain possesses, designated said plasmid as pPGH1 .

[0061] Cutting off said plasmid DNA $5\mu\text{g}$ with restriction enzyme MB oII (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) make), it did agarose gel electrophoresis, it cut the fragment of length approximately 1.9 kb that includes soluble GDH gene. DNA which is isolated and pBluescriptKS(+) $1 \mu \text{g}$ which is cut off with EcoRV (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) make) 16°C and 1 6-hour reaction doing with T4 DNA ligase 1 unit, it connected DNA.

DNA, which it connects, did transformation making use of competent cell of the Escherichia coli JM109 . one discovered colony, which possesses plasmid, which possesses GDH gene in colony, which is acquired, said plasmid pPGH2 designated.

[0062] Working Example 3: Decision of base sequence

Derry Shone Mutant was manufactured in accordance with the conventional method concerning inserted DNA fragment of pPGH2 . various subclone decided base sequence in accordance with conventional method, making use of sequencing * kit (Radioactive Sequencing Kit) (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) make). base sequence and amino acid sequence, which it decides, are as shown in Sequence Number 1 and 2. molecular weight of protein which is sought from amino acid sequence was approximately 52800, almost it agreed with molecular weight of GDH of the Acinetobacter * cull core ceticus N CIB 11517 .

[0063] Working Example 4: Decision of base sequence of soluble GDH of Acinetobacter * Baumann Ni JCM6841

Chromosomal DNA of Acinetobacter * Baumann Ni JCM6841 was separated with method which is similar to Working Example 1, manufacturing recombinant vector which possesses the DNA fragment and said DNA fragment which contain gene which soluble GDH which designates PQQ as supplementary molecule family code is done was executed in same way as Working Example 2, pPGH6 which possesses the inserted fragment of approximately 7 Kbp was acquired. subcloning doing DNA fragment of 4 kb, which includes DNA fragment, which contains gene which GDH code is done from, said plasmid with conventional method , it constructed pPGH7 .

[0064] Next, Derry Shone Mutant was manufactured in accordance with the conventional

method concerning inserted DNA fragment of pPGH7. various subclone decided base sequence in accordance with conventional method, making use of sequencing * kit (Radioactive Sequencing Kit) (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) make). base sequence and amino acid sequence, which it decides, are as shown in Sequence Number 3 and 4. molecular weight of protein which is sought from amino acid sequence was approximately 53000, almost it agreed with molecular weight of GDH of the *Acinetobacter* * Baumann Ni JCM6841 .

[0065] Working Example 5: Can be duplicated with *Pseudomonas* microbe construction of expression vector which

Cutting off plasmid DNA 5 μ g that is acquired with Working Example 3 with restriction enzyme BamHI and XhoI (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) make), it isolated DNA, which includes fragment of the length 1.9Kb, which includes GDH gene. DNA and 1 μ g, which is, isolated 16 °C and the1 6-hour reaction doing pTS1137 , which is, cut off with BamHI and XhoI with T4 DNA ligase 1 unit, it connected DNA. DNA, which it connects, did transformation making use of competent cell of the *Escherichia coli* DH5 α . one discovered colony, which possesses plasmid, which possesses GDH gene in colony, which is acquired, said plasmid pGLD3 designated.

[0066] Working Example 6: Can be duplicated with *Acinetobacter* bacteria construction of expression vector which

Cutting off plasmid DNA 5 μ g that is acquired with Working Example 3 with restriction enzyme MB oII (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) make), it isolated DNA, which includes fragment of length 1.9Kb, which includes GDH gene. DNA and 1 μ g which is isolated 16 °C and the1 6-hour reaction doing pWH1266 which is cut off with MscI (Toyobo Co. Ltd. (DB

69-053-8160) make) with the T4 DNA ligase 1 unit, it connected DNA. DNA, which it connects, did transformation making use of competent cell of the Escherichia coli DH5 α . one discovered colony, which possesses plasmid, which possesses GDH gene in colony, which is acquired, said plasmid pGLD4 designated.

[0067] Comparative Example 1: Construction of expression vector for Escherichia coli host Cutting off plasmid DNA 5 μ g acquired with Working Example 3 with restriction enzyme MB oII (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) make), it isolated DNA, which includes fragment of length 1.8Kb, which includes GDH gene. DNA which is isolated and pBluescript KS(+) 1 μ g which is cut off with EcoRV 16 °C and 1 6-hour reaction doing with T4 DNA ligase 1 unit, it connected DNA. DNA, which it connects, did transformation making use of competent cell of the Escherichia coli JM109 . one discovered colony, which possesses plasmid, which possesses GDH gene in colony, which is acquired, said plasmid pGLD5 designated.

[0068] Comparative Example 2: Designates PQQ from Escherichia coli JM109 /pGLD5 as supplementary molecule family production of GDH which

Terrific broth 500 ml aliquot was done in 2L flask, 121 °C and 15 min autoclave were done, after cooling, separate sterile 50 mg/ml ampicillin 0.5 ml, which is filtered, was added. inoculation it did fermentation broth 5 ml of Escherichia coli JM109 /pPGLD5 which in said culture medium beforehand, the 30 °C and 2 4 hours shaking culture is done with LB culture medium, 2 4 hours aerated stirred culture did with the 37 °C. GDH activity at time of culture end was approximately 0.34 U/ml. On one hand, when PQQ of 10 μ mol after adding, activity measurement is done in activity measurement reagent, it was a 120 U/ml.

[0069] Working Example 7: Possesses PQQ production ability production of transformed host of microorganism which

30 °C and 16 hours it cultured *Pseudomonas putida* TE3493 (NIBH approaching/leaning 12298 number) with LBG culture medium (LB culture medium + 0.3 % glycerol), with the centrifugal separation (12000 rpm and 10 min) cell mass it recovered, suspension it did the cell mass including 5 mM K - phosphate buffer (pH 7.0) 8 ml which includes 300 mM sucrose which ice cooling is done in this cell mass. For second time with centrifugal separation (12000 rpm and 10 min) cell mass it recovered, the suspension it did cell mass including 5 mM K - phosphate buffer (pH 7.0) 0.4 ml which includes the 300 mM sucrose which ice cooling is done in this cell mass.

[0070] Transformation it did including plasmid DNA (pGLD3) 0.5 µg that in said suspension is acquired with Working Example 5, with electroporesis method. From colony, which is grown in LB culture medium, which includes 50 µg/ml streptomycin, the clone, which possesses soluble GDH activity, which designates PQQ as a supplementary molecule family, was acquired.

[0071] In same way, *Pseudomonas putida* TN1126 strain and *Pseudomonas* * AERUGINOSAPA01162 strain, transformed host was acquired from *Pseudomonas* * fluorescence IFO 12568 strain making use of above-mentioned pGLD3 .

[0072] In addition, 30 °C and 16 hours it cultured *Acinetobacter* * cull core ceticus N CIB 11517 with LB culture medium, with centrifugal separation (12000 rpm and 10 min) cell mass it recovered, the suspension it did cell mass including sterile water 8 ml which ice cooling is done in this cell mass. For second time, cell mass it recovered with centrifugal

separation (12000 rpm and 10 min) ,the suspension it designated cell mass as said cell mass including the 10 % glycerol 0.4 ml.

[0073] Transformation it did including plasmid DNA (pGLD4)0.5 μ g that in said suspension 50 μ l is acquired with Working Example 6, with electroporesis method. From colony, which is grown in LB culture medium, which includes tetracycline 50 μ g/ml, the clone, which possesses soluble GDH activity, which designates PQQ as a supplementary molecule family, was acquired.

[0074] Working Example 8: With transformed host which it acquires comparison of GDH activity expression quantity

30 °C and 24 hours it cultured Acinetobacter * cull core ceticus N CIB 11517 with Terrific broth 50 ml (1.2 % polypeptone , 2.4 % yeast extract , 0.4 % NaCl, 17 mM KH₂PO₄ , 72 mM K₂HPO₄ and pH 7.0) transformed host of 5 kind which is acquired with Working Example 7, as the transformed host, and control which are acquired with Comparative Example 2 cell mass it recovered with centrifugal separation (12000 rpm and 3 min) . said cell mass cell mass fragmenting was done in 50 mM tris / hydrochloric acid buffer and pH 7.5 which include CaCl₂ of 1 mM after suspension, with the ultrasound . cell mass residue was removed with centrifugal separation (12000 rpm and 5 min) , crude enzyme solution after manufacturing, GDH activity was measured. Result is shown in Table 1.

[0075] Working Example 9: Designates PQQ from Pseudomonas putida TE3493/pGLD3 as supplementary molecule family production of GDH which

Terrific broth 500 ml aliquot was done in 2L flask, 121 °C and 15 min autoclave were done, after cooling, separate sterile 50 mg/ml streptomycin 0.5 ml, which is filtered, was added.

inoculation it did fermentation broth 5 ml of *Pseudomonas putida* TE3493/pGLD3 which is acquired with Working Example 7 which in said culture medium beforehand, 30 °C and 24 hours shaking culture is done with LB culture medium, 4 8-hour aerated stirred culture did with 37 °C. GDH activity at time of culture end was approximately 45 U/ml.

[0076] Microbe collection it did above-mentioned cell mass with centrifugal separation , the suspension did in 20 mM phosphate buffer and pH 7.0. said cell mass suspension after fragmenting, it did centrifugal separation with French press, it acquired supernatant liquid as crude enzyme solution. After doing nucleic acid removal treatment and ammonium sulfate fractionation treatment with polyethylene imine, the desalting it did said crude enzyme solution with gel filtration due to Sephadex G - 25 (Pharmacia bio tech), the separation and purification doing CM Sepharose (Pharmacia bio tech), with phenyl Sepharose (Pharmacia bio tech) column chromatography , it acquired the purified enzyme standard.

[0077] GDH standard that is acquired with above-mentioned method almost showed single band electrophoresis (SDS - PAGE), in this case specific activity was approximately 2100U/mg - protein.

[0078] Below, property of GDH, which designates PQQ, which is acquired with above-mentioned method as supplementary molecule family, is shown.

Action : D — glucose + artificial electron acceptor → δ - gluconolactone + reducing type electron acceptor

Heat stability : Approximately 50 °C or below (pH 7.5, 30 min treatment)

PH stability : 3.5 to 8.5 (25 °C , 16 hours treatment)

Optimal temperature : Approximately 40 °C

Optimal pH : 7.0

Molecular weight : 50000

[0079] Microbe collection it did above-mentioned cell mass with centrifugal separation , the suspension did in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0). said cell mass suspension after fragmenting, it did centrifugal separation with French press, it acquired supernatant liquid as crude enzyme solution. After doing nucleic acid removal treatment and ammonium sulfate fractionation treatment with polyethylene imine, the desalting it did said crude enzyme solution with gel filtration due to Sephadex G - 25 (Pharmacia bio tech), the separation and purification it did CM Sepharose (Pharmacia bio tech), with phenyl Sepharose (Pharmacia bio tech) column chromatography , acquired the purified enzyme standard.

[0080] GDH standard, which is acquired with this method almost, showed single bandelectrophoresis (SDS - PAGE), in this case specific activity was approximately 85U/ mg - protein. This enzyme CaCl_2 of 1 mM and under PQQ existing of the $10 \mu \text{mol}$, 37°C and 1 hour incubate after doing, specific activity was measured, but it was no more than an approximately 460U/ mg - protein.

[0081] Working Example 10: Powdering of GDH

Lyophilizing after doing GDH of Working Example 9 which is melted in the CaCl_2 of 1 mM and in various buffer which include BSA (Vis-a-vis GDH 1.0 parts by weight 1.0 parts by weight),the residue behavior of GDH activity in 37°C was measured. Result is shown in Table 2.

[0082]

形質転換体によるグルコースデヒドロゲナーゼ活性発現量

形質転換体	活性発現量 (U/ml)
<i>P. putida</i> TB3493/pGLD3	4.3
<i>P. putida</i> TN1126/pGLD3	2.6
<i>P. aeruginosa</i> PA01162/pGLD3	3.0
<i>P. fluorescens</i> IF012568/pGLD3	2.7
<i>A. calcoaceticus</i> NCIB11517/pGLD4	2.2
<i>E. coli</i> JM109/pGLD5 (比較例2)	0.23
<i>A. calcoaceticus</i> NCIB11517 (対照)	1.6

培養液 1 ml 当たりの酵素活性

[Table 1]

[0083]

グルコースデヒドロゲナーゼ粉末の安定性

緩衝液	残存活性 (%)	
	凍結乾燥直後	37°C, 3日間
トリス塩酸, pH 7.5	98.6	38.8
PIPES, pH 6.5	99.8	101.0
MES, pH 6.5	102.0	99.6
MOPS, pH 6.5	99.2	52.4
HEPES, pH 7.0	101.0	28.3

凍結乾燥前のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を100とする

[Table 2]

[0084]

[Effectiveness of the Invention] Above-mentioned way, regarding to this invention, glucose dehydrogenase which designates PQQ as supplementary molecule family was isolated. In addition, manufacturing method of GDH which designates PQQ as a supplementary molecule family with genetic engineering technology which utilizes host-vector system which uses microorganism which possesses PQQ production ability, was established. According to manufacturing method of this invention, GDH which designates the highly pure PQQ as supplementary molecule family it is possible to produce efficiently in inexpensive.

[0085]

< sequence table >

Sequence Number : 1

Length of sequence : 480

Form of sequence : Amino acid

Topology : Straight chain

Kind of sequence : Protein

Origin

Organism name : Acinetobacter * cull core ceticus (Acinetobacter calcoaceticus)

Strain name : N CIB 11517

Arrangement

Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln

1 5
10 15
Leu Phe Thr Phe His Thr Ala Phe Ala Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala
20
25 30
Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr GluA sn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu
35 40 45
Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln
50 55 60
Ile Trp Leu Thr GluA rg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro
65 70 75 80
Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Ser
85
90 95
Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp
100
105 110
Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro
115 120 125

Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr

130 135 140

Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile

145 150 155 160

Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile

165

170 175

Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn

180

185 190

Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr

195 200 205

Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val

210 215 220

Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Val Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe

225 230 235 240

Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln

245

250 255

Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly
260

265 270

Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr
275 280 285

Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr
290 295 300

Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala
305 310 315 320

Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser
325 330 335

Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr
340

345 350

Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala
355 360 365

Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr
370 375 380

Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp GluA sn Thr Leu Leu Val Pro

385 390 395 400
Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr
405
410 415
Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg
420
425 430
Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu
435 440 445
Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His
450 455 460
Thr Leu GluA sn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys
465 470 475 480

[0086] Sequence Number : 2

Length of sequence : 1443

Form of sequence : Nucleic acid

Topology : Straight chain

Type of sequence : Genomic DNA

Origin

Organism name : Acinetobacter * cull core ceticus (Acinetobacter calcoaceticus)

Strain name : N CIB 11517

Arrangement

ATG AAT AAA CAT TTA TTA GCA AAA ATC ACT CTT TTA GGT GCT GCA CAA

48

Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln

1 5

10 15

CTA TTT ACG TTT CAT ACG GCA TTT GCA GAT ATA CCT CTG ACA CCT

GCT 96

Leu Phe Thr Phe His Thr Ala Phe Ala Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala

20

25 30

CAG TTC GCA AAA GCG AAA ACA GAA AAT TTT GAT AAA AAA GTG ATT

CTG 144

Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr GluA sn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu

35 40 45

TCC AAT TTA AAT AAA CCA CAT GCT TTG TTA TGG GGG CCA GAT AAT CAA

192

Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln

50 55 60

ATT TGG TTA ACC GAA CGT GCA ACT GGC AAA ATT TTA AGA GTA AAT C CT

240

Ile Trp Leu Thr GluA rg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro

65 70 75 80

GTA TCT GGT AGC GCG AAA ACA GTA TTT CAG GTT CCT GAA ATT GTG

AGT 288

Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Ser

85

90 95

GAT GCT GAT GGG CAA AAT GGT

TTG TTA GGT TTT GCT TTT CAT C CT GAC 336

Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp

100

105 110

TTT AAA CA T AAC C CT TAT ATC TAT ATT TCA GGC ACT TTT AAA AAT CCA

384

Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro

115 120 125
AAA TCT ACA GAT AAA GAG TTA
CCT AAT CAG ACG ATT ATT CGT AGA TAT 432
Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr
130 135 140
ACC TAT AAT AAA ACT ACA GAT ACA TTT GAA AAG CCT ATT GAT TTG ATT
480
Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile
145 150 155 160
GCA GGT TTA CCG TCA TCA AAA GAT CAT CAG TCT GGT CGT CTC GTT ATT
528
Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile
165
170 175
GGT CCA GAC CAA AAA ATC TAC TAT ACG ATT GGT GAC CAA GGT CGT AAT
576
Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn
180
185 190
CAG TTA GCT TAT CTG TTC TTA CCG AAT CAG GCA CAG CAT ACT CCG ACT

Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr

195 200 205

CAG CAA GAG CTC AAT AGT AAA GAC

TAC CAT ACA TAT ATG GGT AAA GTA 672

Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val

210 215 220

TTA CGC TTA AAT CTG GAC GGC

AGT GTA CCT AAA GAC AAC CCA AGC

TTT 720

Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Val Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe

225 230 235 240

AAC GGC GTA GTG AGT CAT ATC TAC ACT TTA GGG CAC CGT AAT CCA CAA

768

Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln

245

250 255

G GT TTA GCA TTT GCC CCA AAT GGA AAG CTT TTA CAA TCT GAG CAA GGA

816

Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly

260

265 270

CCA AAT TCT GAT GAT GAA

ATT AAC CTT GTA TTA AAA GGT GGT AAC TAT 864

Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr

275 280 285

GGC TGG CCA AAT GTA GCT GGT TAT AAA GAT GAC AGT GGT TAT GCC

TAT 912

Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr

290 295 300

GCA AAC TAT TCG GCA GCA ACC AAT AAA TCA CAA ATT AAA GAT TTA GCT

960

Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala

305 310 315 320

CAA AAC GGG ATA AAA GTA GCA ACA GGT GTT CCT GTG ACT AAA

GAG TCT 1008

Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser

325

330 335

GAA TGG ACT GGT AAA AAC TTT GTG CCG CCT TTG AAA ACT TTA TAT ACG
1056

Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr

340 345 350

GTA CAA GAT ACC TAT AAC TAT AAT GAC CCT ACT TGT GGT GAG ATG GCA
1104

Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala

355 360 365

TAT ATT TGC TGG CCA ACG GTT GCA CCG TCA TCA GCA TAT GTA TAT ACG
1152

Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr

370 375 380

GGA GGC AAA AAA GCG ATT CCA GGG

TGG GAA AAT ACA TTA TTG GTC CCA 1200

Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp GluA sn Thr Leu Leu Val Pro

385 390 395 400

TCT TTA AAA CGT GGG GTG ATT TTC CGT ATT AAA TTG GAC CCG ACA TAT
1248

Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr

405

410 415

AGC ACG ACT TTG GAT GAT GCT ATC CCA ATG TTT AAA AGC AAT AAC CGT

1296

Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg

420

425 430

TAT CGT GAT GTC ATC GCT AGT

CCA GAA GGT AAT ACC TTA TAT GTG CTG 1344

Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu

435 440 445

ACT GAT ACA GCG GGG AAT GTA CAA AAA GAT GAT GGT TCT GTC

ACT CAT 1392

Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His

450 455 460

ACT TTA GAG AAT CCC GGT TCT CTC ATT AAA TTT ACA TAT AAC GGT

AAG 1440

Thr Leu GluA sn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys

465 470 475 480

TAA

1443

[0087] Sequence Number : 3

Length of sequence : 480

Form of sequence : Amino acid

Topology : Straight chain

Kind of sequence : Protein

Origin

Organism name : Acinetobacter * Baumann Ni (Acinetobacter baumannii)

Strain name : JCM6841

Arrangement

Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln

1 5

10 15

Leu Phe Thr Phe His Thr Ala Phe Ala Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala

20 25 30

Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr GluA sn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu

35 40 45

Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln

50 55 60

Ile Trp Leu Thr GluA rg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro
65 70 75 80
Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Ser
85
90 95
Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp
100
105 110
Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro
115 120 125
Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr
130 135 140
Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile
145 150 155 160
Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile
165
170 175
Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn
180

185 190
Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Ser Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr
195 200 205
Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val
210 215 220
Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe
225 230 235 240
Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln
245
250 255
Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly
260 265 270
Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr
275 280 285
Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr
290 295 300
Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala
305 310 315 320
Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser

330 335

Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr

340 345 350

Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala

355 360 365

Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr

370 375 380

Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp GluA sn Thr Leu Leu Val Pro

385 390 395 400

Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr

405

410 415

Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg

420

425 430

Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu

435 440 445

Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His

450 455 460

Thr Leu GluA sn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys

465 470 475 480

[0088] Sequence Number : 4

Length of sequence : 1443

Form of sequence : Nucleic acid

Topology : Straight chain

Kind of sequence : Genomic DNA

Origin

Organism name : Acinetobacter * Baumann Ni (Acinetobacter baumannii)

Strain name : JCM6841

Arrangement

ATG AAT AAA CAT TTA TTA GCA AAA ATC ACT CT T TTA GGT GCT GCA CAA

48

Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln

1 5

10 15

CTA TTT ACG TTT CAT ACG GCA TTT GCA GAT ATA CCT CTG ACA CCT

GCT 96

Leu Phe Thr Phe His Thr Ala Phe Ala Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala

20

25 30

CAG TTC GCA AAA GCG AAA ACA GAA AAT TTT GAT AAA AAA GTG ATT

CTG 144

Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr GluA sn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu

35 40 45

TCC AAT TTA AAT AAA CCA CAT GCT TTG TTA TGG GGG CCA GAT AAT CAA

192

Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln

50 55 60

ATT TGG TTA ACC GAA CGT GCA ACT GGC AAA ATT TTA AGA GTA AAT CCT

240

Ile Trp Leu Thr GluA rg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro

65 70 75 80

GTA TCT GGT AGC GCG AAA ACA GTA TTT CAG GTT CCT GAA ATT

GTG AGT 288

Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Ser

85

90

95

GAT GCT GAT GGG CAA AAT GGT

TTG TTA GGT TTT GCT TTT CAT CCT GAC 336

Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp

100

105 110

TTT AAA CAT AAC CCT TAT ATC TAT ATT TCA GGC ACT TTT AAA AAT CCA

384

Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro

115 120 125

AAA TCT ACA GAT AAA GAG TTA

CCT AAT CAG ACA ATT ATT C GTA GA TAT 432

Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr

130 135 140

ACC TAT AAT AAA ACT ACA GAT ACA TTT GAA AAG CCT ATT GAT TTG

ATT 480

Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile

145 150 155 160

GCA GGT TTA CCG TCA TCA AAA GAT CAT CAG TCT GGT CGT CTC GTT ATT

Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile

165

170 175

Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn

180

185 190

CAG TTA GCT TAT CTA TTC TTA TCG AAT CAG GCA CAG CAT ACT CCG ACT

624

Gln Leu Ala. Tyr Leu Phe Leu Ser Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr

195 200 205

CAG CAA GAG CTC AAT AGT

AAA GAC TAC CAT ACA TAT ATG

GGT A AA GTA 672

Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val

210 215 220

TTA CGC TTA AAT CTG GAC GGC AGT

ATA CCT AAA GAC A AC CCA AGC TTT 720

Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe

225 230 235 240

AAC GGC GTA GTG AGT CAT

ATC TAC ACT TTA GGG CAC CGT

AAT CCA CAA 768

Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln

245 250 255

G GT TTA GCA TTT GCC CCA AAT

GGA AAG CTT TTA CAA TCT GAG

CAA GGG 816

Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly

260 265 270

CCA AAT TCT GAT GAT GAA ATT AAC CT T GTA TTA AAA GGT GGT AAC

TAT 864

Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr

275 280 285

GGC TGG CCA AAT GTA GCT

GGT TAT AAA GAT GAC AGT GGT

TAT GCC TAT 912

Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr

290 295 300

GCA AAC TAT TCG GCA GCA

ACC AAT AAA TC ACA A ATT AAA

GAT TTA G CT 960

Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala

305 310 315 320

CAA AAC GGG ATA AAA GTA GCA ACA GGT GTT CCT GTG ACT AAA

GAG TCT 1008

Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser

325

330 335

GAA TGG ACT GGT AAA AAC TTT

GTG CCA CCT TTG AAA ACT TTA TAT ACG 1056

Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr

340

345 350

GTA CAA GAT ACC TAT AAC TAT

AAT GAC CCT ACT TGT GGT GAG ATG GCA 1104

Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala

355 360 365
TAT ATT TGC TGG CCA ACG GT T GCA CCG TCA TCG GCA TAT GTA TAT ACG
1152
Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr
370 375 380
GGA GGC AAA AAA GCG ATT CCA GG GT GG GAA AAT ACA TTA TTG GTC
CCA 1200
Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp GluA sn Thr Leu Leu Val Pro
385 390 395 400
TCT TTA AAA C GT GGG GT G ATT TTC C GTA TT AAA TTG GAC CCG ACA
TAT 1248
Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr
405
410 415
AGC ACG ACT TTG GAT GAT GCT ATC CCA ATG TTT AAA AGC AAT AAC CGT
1296
Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg
420
425 430
TAT CGT GAT GTC ATC GCT AGT

CCA GAA GGT AAT ACC TTA TAT GTG CTG 1344

Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu

435 440 445

ACT GAT ACA GCG GGA AAT GTA CAA AAA GAT GAT GGT TCA GTC ACT
CAT 1392

Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr His

450 455 460

ACT TTA GAG AAT CCC GGT TCT CTC ATT AAA TTT ACA TAT AAC GGT
AAG 1440

Thr Leu Glu A sn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys

465 470 475 480

TAA 1443